

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES BIOMÉDICALES ET PHARMACEUTIQUES

Pathogénie d'une dermatophytose (*Trichophyton rubrum*) sur épiderme humain reconstruit

Faway, Émilie

Award date:
2018

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

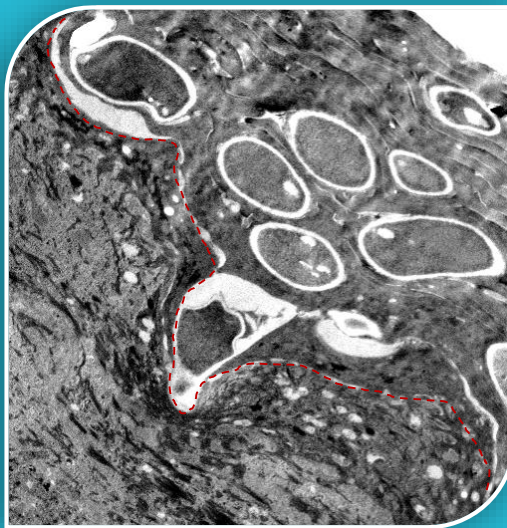
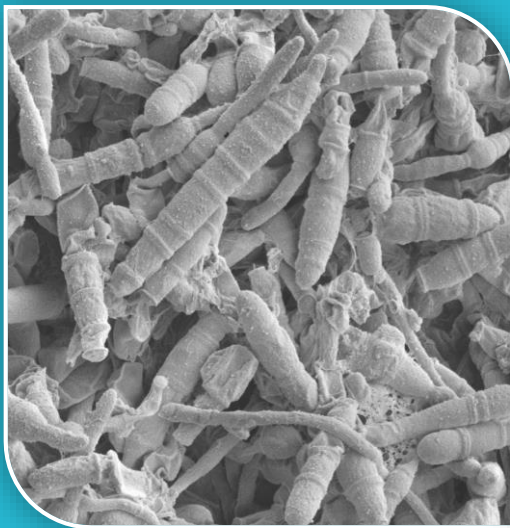
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Pathogénie d'une dermatophytose (*Trichophyton rubrum*) sur épiderme humain reconstruit

Dissertation présentée en vue de l'obtention du
grade de Docteur en Sciences Biomédicales et
Pharmaceutiques

Emilie
Faway

Mars
2018



narili

NAmur Research Institute For Life Sciences

Composition du jury :

Pr. Xavier De Bolle, *président du jury*

Pr. Véronique Del Marmol

Dr. Nathalie Jonca

Dr. Catherine Lambert de Rouvroit, *co-promotrice*

Pr. Bernard Mignon

Pr. Michel Monod

Pr. Yves Poumay, *promoteur*

Université de Namur, Belgique

Université Libre de Bruxelles, Belgique

Université de Toulouse III Paul Sabatier, France

Université de Namur, Belgique

Université de Liège, Belgique

Université de Lausanne, Suisse

Université de Namur, Belgique

« Quand on voyage vers un objectif, il est très important de prêter attention au chemin, c'est toujours le chemin qui nous enseigne la meilleure façon d'y parvenir, et il nous enrichit à mesure que nous le parcourons »

de Paulo Coelho

Au terme de ces quatre années de thèse, je tiens à adresser quelques remerciements aux personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, le Professeur **Yves Poumay**, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire. Merci aussi pour votre disponibilité, vos conseils et votre regard critique tout au long de ce travail.

Un énorme merci à ma co-promotrice, le Docteur **Catherine Lambert de Rouvroit**, pour son accompagnement de tous les jours, pour ses conseils avisés et pour son optimisme. Tu as été d'un grand réconfort dans les moments de stress.

Merci aux membres de mon comité de thèse pour leur disponibilité et leurs conseils. Merci particulièrement au Professeur **Bernard Mignon**, sans qui ce projet de recherche n'aurait probablement jamais vu le jour, pour le partage de ses connaissances dans le domaine de la mycologie. Merci aussi au Professeur **Xavier De Bolle** qui, grâce à son regard externe, a permis d'enrichir ce travail.

Merci aux membres de mon **jury de thèse**, les Professeurs Xavier De Bolle, Véronique Del Marmol, Bernard Mignon, Michel Monod et Yves Poumay ainsi que les Docteurs Nathalie Jonca et Catherine Lambert de Rouvroit, qui ont pris le temps de lire ce travail avec grande attention et qui ont contribué à l'amélioration de ce manuscrit. Merci aussi à eux pour la discussion enrichissante que nous avons partagée et pour vos conseils et encouragements lors de la soutenance privée de cette thèse.

Un merci particulier à **Ludivine Cambier** qui m'a appris, avec beaucoup de patience et de pédagogie, tout ce qu'il y avait à savoir sur la culture des dermatophytes. Merci également à tous les membres du **projet MycAvert**, les Professeurs Brigitte Evrard, Moreno Galleni, Bernard Mignon, Arjen Nikkels et Yves Poumay, les Docteurs Ludivine Cambier, Astrid Freichels, Catherine Lambert de Rouvroit, Géraldine Piel et Julie Vignisse, ainsi que Charline Defourny, pour la coopération que nous avons pu établir. J'en profite également pour remercier la **Région Wallonne** qui a financé en grande partie ce projet.

Merci à **Evelyne De Vuyst**, **Jérémy Malaisse** et **Abdallah Mound** pour leur aide (et leur patience) dans l'explication et dans la réalisation de l'analyse statistique de mes résultats. Merci à **Benoît Balau**, **Valérie De Glas**, **Kathleen De Swert** et **Daniel Van Vlaender** pour leurs conseils et leur aide technique dans la réalisation de mes manipulations. Merci aussi à eux pour l'apprentissage des techniques en début de thèse et pour la réalisation, un peu dans l'urgence, des dernières expériences en fin de thèse.

Merci au Professeur **Marc Thiry** et à **Patricia Piscicelli**, du laboratoire de Biologie Cellulaire et Tissulaire de l'ULg, et à **Corry Charlier**, du service de microscopie électronique de l'UNamur, pour leur aide dans la réalisation de la microscopie électronique. Merci aussi au professeur **Jacques Gilloteaux** pour ses conseils dans ce domaine.

De manière générale je remercie tous les **occupants du 5^e étage**, Benoît Balau, Valérie De Glas, Kathleen De Swert, Evelyne De Vuyst, Céline Evrard, Catherine Lambert de Rouvroit, Yves Poumay, Daniel Van Vlaender sans oublier Joanna Bouchat, Delphine Del Marmol, Patrick Glesner et Charles Nicaise pour la bonne humeur et l'entraide qui y règne.

Je remercie particulièrement **Kathleen De Swert**, ma collègue de bureau depuis le début, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et son soutien moral. Plus qu'une collègue, tu es devenue une amie et nos petites discussions et confidences ont rendues les longues journées de labo bien plus agréables.

Un merci particulier est également adressé à **Evelyne De Vuyst** et **Céline Evrard**, mes compagnes de congrès, pour leur sympathie et leur bonne humeur. Toujours une histoire à raconter ou une chanson en tête pour faire passer le temps des longs trajets. Vivement notre prochaine escapade en Floride !

Je remercie mon **papa** et ma **maman** pour leurs encouragements de tous les jours, pour m'avoir toujours poussée à donner le meilleur de moi-même et pour m'en avoir donné les moyens.

Enfin je remercie **Pierre**, mon compagnon dans la vie, pour sa patience et son soutien qui m'ont beaucoup aidé dans les moments de doute. Tu as toujours su trouver les mots qu'il fallait pour me faire rire ou pour me remonter le moral. Merci d'être là chaque jour à mes côtés.

Emilie

Table des matières

INTRODUCTION	8
1. La peau	10
1.1. Structure et différenciation de l'épiderme humain	11
1.2. Jonctions intercellulaires dans l'épiderme	14
1.3. Barrières épidermiques	20
1.4. Epiderme humain reconstruit	26
2. Dermatophytes et dermatophytoses	28
2.1. Généralités	28
2.2. Signes cliniques et lésions des dermatophytoses	29
2.3. Contamination et prédispositions génétiques	32
2.4. Structure et développement des dermatophytes	33
2.5. Cycle d'infection	36
3. Défenses contre les dermatophytes	41
3.1. Défenses cutanées non-immunitaires	41
3.2. Immunité anti-dermatophytes	41
4. Traitement des dermatophytoses	50
5. Modèle expérimentaux de dermatophytose	51
OBJECTIFS	54
RESULTATS	58
PARTIE 1 : Mise au point et caractérisation d'un modèle d'infection par le dermatophyte anthropophile <i>Trichophyton rubrum</i> sur épiderme humain reconstruit	60
1. Matériel et méthodes additionnels	79
2. Résultats additionnels	82
PARTIE 2 : Etude de l'impact de l'infection sur la barrière épidermique et réponse des kératinocytes	90
1. Supplementary material	110
2. Supplementary results	111
DISCUSSION	118
1. Modèle de dermatophytose sur épiderme humain reconstruit	120
2. Cycle d'infection des arthrospores de <i>T. rubrum</i> sur RHE	123
3. Impacts de l'infection sur la barrière épidermique et réaction des kératinocytes	126
4. Conclusion	128
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	132
ANNEXES	150

Liste des abréviations

AAPF-pNa	N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-P-nitroanilide
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomique
ARN	Acide ribonucléique
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumine de sérum bovin)
CARD9	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 9</i>
cDNA	ADN complémentaire
CDSN	Cornéodesmosine
CFU	<i>Colony-forming unit</i> (unité formant colonie)
cldn	Claudine
CLR	<i>C-type lectin receptor</i> (récepteur à lectine de type C)
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DEFB	<i>Defensin beta cluster</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DP	Desmoplakine
Dpp	Dipeptidyl-peptidase
DSG	Desmogléine
DSC	Desmocolline
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>
hBD1	β -défensine-1
hBD2	β -défensine-2
hBD3	β -défensine-3
HE	Hémalum érythrosine
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HMDS	Hexamethyldisilazane
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IFN γ	Interféron gamma
IL	Interleukine
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthetase</i>
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
JAM	<i>Junctional adhesion molecules</i>
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
KLK	Kallikréine
KO	<i>Knockout</i>
Lap	Leucine aminopeptidase
LY	Lucifer Yellow
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEP	Métalloprotéase
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
MUPP-1	<i>Multi-PDZ protein-1</i>

NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
NF κ B	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
ocln	Occludine
PAM / AMP	Peptide antimicrobien / <i>Antimicrobial peptide</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PAS	<i>Periodic acid Schiff</i> (acide periodique de Schiff)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampon phosphate salin)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PG	Plakoglobine
PKP	Plakophiline
PMN	Polymorphonucléaire neutrophile
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
qPCR	PCR quantitative
RHE	<i>Reconstructed human epidermis</i> (épiderme humain reconstruit)
RNase 7	Ribonucléase-7
ROR γ t	<i>Retinoid-related orphan receptor gamma t</i>
RT	Reverse transcription
SC	<i>Stratum corneum</i> (couche cornée)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM / MEB	<i>Scanning electron microscopy</i> / Microscopie électronique à balayage
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Sub	Subtilisine
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TEER	<i>Trans-epithelial electrical resistance</i> (résistance électrique transépithéliale)
TEM / MET	<i>Transmission electron microscopy</i> / Microscopie électronique à transmission
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TJ	<i>Tight junction</i> (jonction étanche)
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TSG-6	<i>TNFα-stimulated gene 6</i>
UV	Rayonnements ultraviolets
YEN	Yeast Extract Nitrogen
ZO	<i>Protein zonula occludens</i>

INTRODUCTION

1. La peau

La peau est l'organe qui recouvre le corps humain et qui a pour fonction de protéger celui-ci contre les agressions extérieures (barrière externe-interne), qui peuvent être physiques, chimiques ou infectieuses, et contre la déshydratation en empêchant la perte d'eau (barrière interne-externe). La peau joue également un rôle dans le maintien de la température corporelle par ajustement du calibre des capillaires périphériques et par production de la sueur (Freinkel 2001).

La peau est constituée de trois couches : l'hypoderme, le derme et l'épiderme (**Figure 1**) (Haake 2001).

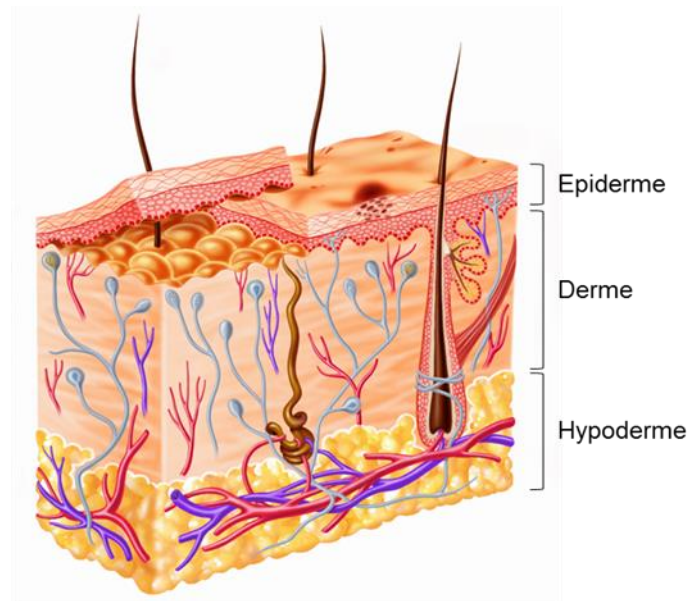


Figure 1 : Schéma¹ représentant la structure de la peau constituée de trois couches, de la plus interne à la plus superficielle : l'hypoderme, le derme et l'épiderme.

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Il est constitué d'un tissu conjonctif lâche richement vascularisé et contient du tissu adipeux en quantité variable en fonction de sa localisation anatomique. L'hypoderme joue un rôle dans la protection de l'organisme contre les chocs physiques et les variations de température et sert de réserve adipeuse.

Le derme, couche intermédiaire de la peau, est composé d'un tissu conjonctif riche en fibres de collagène et en fibres élastiques, parcouru de nombreux vaisseaux sanguins, vaisseaux lymphatiques, nerfs et terminaisons nerveuses. Il est responsable de la stabilité et de l'élasticité de la peau ainsi que de l'apport de nutriments et des cellules immunitaires. C'est également au niveau du derme que se localisent les principales annexes cutanées, telles les follicules pileux, les glandes sébacées, responsables de la production du sébum, et les glandes sudoripares, à l'origine de la sueur.

¹ Schéma provenant de l'article « *Natural Immunity of the Body* » publié sur le site internet INTERACTIVE BIOLOGY, <http://www.interactive-biology.com>, consulté le 11/10/2017

Directement exposé à l'environnement de l'organisme, l'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau et consiste en un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé dont l'épaisseur varie de 50 à 150 μm en fonction de la zone du corps concernée ; l'épiderme étant le plus épais au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds. L'épiderme s'ancore sur le derme via la lame basale qui est une organisation spécialisée de protéines de la matrice extracellulaire. Collagène de type IV, plusieurs laminines, nidogène et perlécane s'y trouvent disposés pour réaliser l'ancrage de l'épiderme au derme auquel contribuent les hémidesmosomes (voir paragraphe **1.2.1. Desmosomes, cornéodesmosomes et hémidesmosomes**). Cette interface d'ancrage entre épiderme et derme est souvent nommée « jonction épidermo-dermique » (Masunaga 2006, Hashmi 2015). Etant directement au contact de l'environnement extérieur, l'épiderme constitue la première barrière de l'organisme.

1.1. Structure et différenciation de l'épiderme humain

L'épiderme est majoritairement composé de cellules constitutives, appelées les kératinocytes, qui comptent pour 90 à 95% de la population cellulaire épidermique (Haake 2001). On y trouve aussi, intercalés entre les kératinocytes, trois autres types cellulaires qui sont les mélanocytes et les cellules de Langerhans, en tant que cellules infiltrantes, et les cellules de Merkel qui proviennent d'une différenciation particulière de kératinocytes. Les mélanocytes sont responsables de la production de la mélanine qui produit la pigmentation de l'épiderme, des poils et des cheveux, et procurent une protection contre les effets néfastes des rayonnements ultraviolets (UV) (Costin 2007). Les cellules de Langerhans sont quant à elles des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes et agissent comme des senseurs du système immunitaire infiltrés en position suprabasale dans l'épiderme et prêts à activer les réponses immunitaires en cas d'agression (Streilein 1984). Enfin, les cellules de Merkel sont des cellules qui se différencient au cours de l'embryogenèse en composants du système neuroendocrinien positionnés à la base de l'épiderme et en connexion avec des terminaisons nerveuses cutanées (Van Keymeulen 2009). Elles sont impliquées dans la sensibilité de la peau (Maksimovic 2017).

Dans l'épiderme, les kératinocytes sont organisés en quatre couches bien distinctes au sein desquelles ils progressent, depuis la couche la plus interne vers la couche la plus superficielle, en subissant un processus progressif de différenciation terminale appelé la kératinisation (Haake 2001). La kératinisation implique plusieurs événements morphologiques et métaboliques qui sont : la perte de la capacité proliférative avec la perte d'ancrage à la lame basale, l'augmentation de la taille et l'aplatissement des kératinocytes, la réorganisation puis la perte des organites, la synthèse de protéines et de lipides spécifiques et diverses modifications des propriétés de la membrane plasmique. Au terme de la kératinisation, les kératinocytes sont morts, aplatis, dépourvus d'organites, remplis de filaments intermédiaires de kératine et d'une matrice protéique et entourés d'une membrane cellulaire renforcée (Candi 2005). Ils sont alors appelés « cornéocytes » et jouent un rôle primordial dans la constitution de la barrière épidermique et dans la résistance mécanique superficielle de ce tissu.

Concrètement, les kératinocytes prolifèrent au niveau de la couche basale avant de traverser les couches épineuse et granuleuse pour finalement atteindre la couche cornée depuis laquelle les cornéocytes morts sont finalement et régulièrement détachés par le phénomène de desquamation (**Figure 2**). L'épaisseur de l'épiderme est maintenue constante par un équilibre entre prolifération et desquamation. En condition normale, 28 jours sont nécessaires

pour renouveler complètement l'épiderme (Haake 2001). Il faut en effet 14 jours aux kératinocytes pour atteindre la couche cornée et 14 jours supplémentaires pour transiter à travers celle-ci et être finalement éliminés.

Les kératinocytes présents dans chacune des quatre couches épidermiques présentent une morphologie, des fonctions et des marqueurs spécifiques tandis qu'ils subissent le processus de kératinisation (Haake 2001).

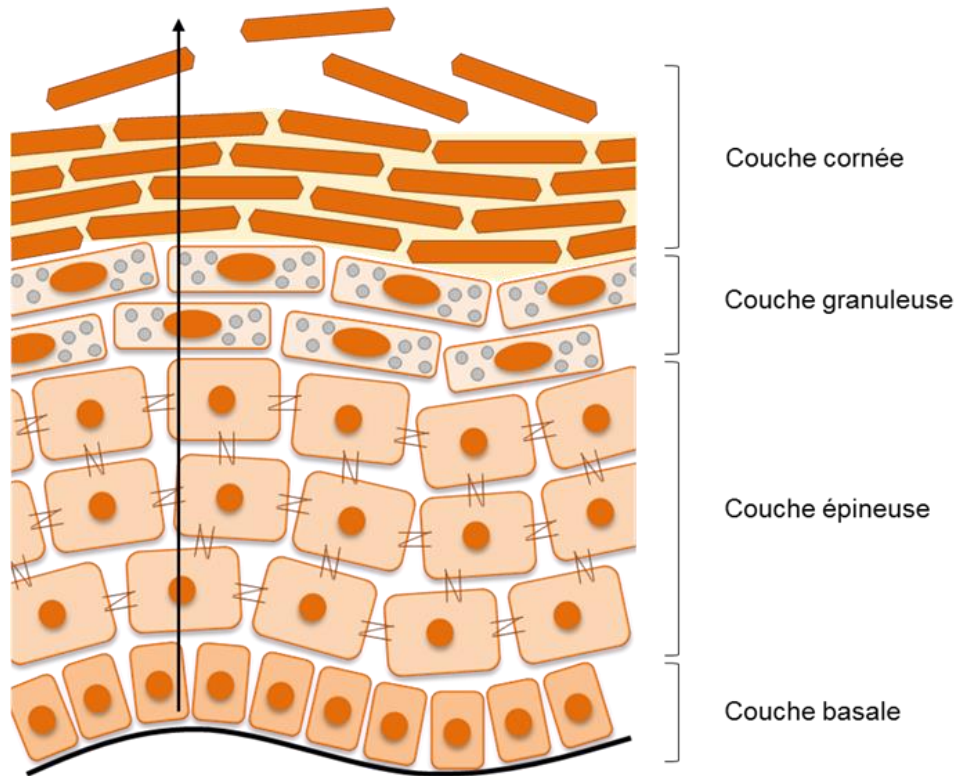


Figure 2 : Schéma simplifié de la structure de l'épiderme humain constitué majoritairement de kératinocytes organisés en quatre couches : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée. Les kératinocytes prolifèrent dans la couche basale avant d'entamer un processus de différenciation terminale, appelé la kératinisation, tout en progressant vers la surface épidermique (sens de la flèche).

1.1.1. Couche basale

Dans la couche basale, aussi appelée couche germinative, les kératinocytes ont une forme cubique et un noyau volumineux. Ils sont attachés entre eux via des desmosomes et des jonctions adhérentes et à la lame basale par l'intermédiaire des hémidesmosomes (voir paragraphes **1.2.1. Desmosomes, cornéodesmosomes et hémidesmosomes** et **1.2.2. Jonctions adhérentes**) (Haake 2001). La prolifération des kératinocytes est importante et continue dans la couche basale, grâce à la présence de cellules souches et de cellules d'amplification transitoire. Cette prolifération est responsable du renouvellement constant de l'épiderme : les nouveaux kératinocytes prenant la place des anciens en poussant ceux-ci vers les couches supérieures de l'épiderme et vers la desquamation (Barrandon 1987, Fairley 2001).

1.1.2. Couche épineuse

La couche épineuse est formée de quatre à cinq assises de kératinocytes de forme polygonale et de plus en plus aplatis au fur et à mesure qu'ils approchent de la couche granuleuse (Haake 2001). Ils sont fortement liés entre eux par de nombreux desmosomes qui donnent aux cellules un aspect « hérissé » lorsqu'elles sont observées en microscopie. En effet, les traitements infligés au tissu dans le but de leur étude histologique provoquent une rétraction des cellules qui, retenues entre-elles par les desmosomes, forment les « épines » qui sont à l'origine du nom attribué à cette couche de l'épiderme. Des jonctions adhérentes sont aussi présentes. Les kératinocytes de la couche épineuse participent à la défense immunitaire de l'épiderme via leur forte capacité de phagocytose (Wolff 1971). Dans les dernières assises de la couche épineuse, un nouvel organite apparaît : il s'agit des corps lamellaires dont la fonction ne s'exerce qu'à la transition entre les couches granuleuse et cornée.

1.1.3. Couche granuleuse

La couche granuleuse est la dernière couche nucléée et donc vivante de l'épiderme. Elle est constituée de deux à trois assises de kératinocytes volumineux mais aplatis, pourvus de noyaux pycnotiques écrasés entre les corps lamellaires et les grains de kératohyaline qui remplissent le cytoplasme (Haake 2001). Les corps lamellaires sont des structures vésiculaires émanant de l'appareil de Golgi et contenant principalement des lipides, des céramides et des hydrolases acides, qui seront libérés par exocytose au contact de la couche cornée et qui prendront part à l'organisation de la matrice intercellulaire lipidique. Ils contiennent aussi des peptides antimicrobiens (Oren 2003, Braff 2005a) et la cornéodesmosine qui sera intégrée aux desmosomes avant que ceux-ci ne deviennent des cornéodesmosomes dans la couche cornée (Jonca 2011, Ishida-Yamamoto 2015). Dans les dernières assises de la couche granuleuse, les corps lamellaires peuvent occuper jusqu'à 20% du volume cellulaire total (Menon 2012). Les grains de kératohyaline sont quant à eux des amas de profilaggrine, précurseur de la filaggrine indispensable à l'agrégation des filaments de kératine dans les cornéocytes (Dale 1990). Les grains de kératohyaline peuvent aussi contenir de l'involucrine et de la loricine, deux protéines participant à l'établissement de l'enveloppe cornée. En ce qui concerne les jonctions intercellulaires, la couche granuleuse est caractérisée par la présence de desmosomes et de jonctions adhérentes, mais surtout par l'établissement des jonctions étanches (voir paragraphe **1.2.4. Jonctions étanches**). Ces dernières, retrouvées exclusivement dans la dernière assise de kératinocytes de la couche granuleuse (Yoshida 2013), contrôlent les flux paracellulaires de molécules (Kirschner 2010, Kirschner 2013) et jouent également un rôle dans la polarisation de l'exocytose des corps lamellaires (Kuroda 2010).

1.1.4. Couche cornée

La couche cornée est la couche la plus externe de l'épiderme. Elle est constituée de kératinocytes morts, aplatis et dépourvus d'organites, appelés cornéocytes, entre lesquels s'organise une matrice lipidique (Haake 2001). Ensemble cornéocytes et matrice lipidique forment une structure extrêmement résistante, à l'image d'un mur de briques où les cornéocytes seraient les briques alors que les lipides joueraient le rôle du mortier (Michaels 1975). L'épaisseur de la couche cornée est fortement variable en fonction du site anatomique, allant de quelques empilements de cornéocytes dans la zone génitale à près de 100 empilements au niveau de la peau située sous le talon (Ya-Xian 1999).

Les cornéocytes sont des cellules extrêmement résistantes grâce à l'établissement de l'enveloppe cornée et à leur contenu riche en kératine. L'enveloppe cornée se met en place juste sous la membrane plasmique et est une structure formée par association de nombreuses protéines, dont la loricrine et l'involucrine, via l'établissement de liaisons covalentes par la transglutaminase-1 (Candi 2005). Des lipides seront également incorporés à cette structure, remplaçant peu à peu la membrane plasmique et assurant la cohésion avec la matrice lipidique extracellulaire. D'autre part, les cornéocytes sont remplis de filaments intermédiaires de kératine agrégés en une structure résistante par l'établissement de ponts disulfures et par la filaggrine, dont la forme active est obtenue suite à la maturation de la profilaggrine (Sandilands 2009). La kératine constitue plus de 85% du contenu protéique des cornéocytes (Eckhart 2013) et, ensemble, kératine et filaggrine représentent 80 à 90% de la masse de l'épiderme chez les mammifères (Candi 2005). Les cornéocytes sont attachés entre eux par des cornéodesmosomes, qui sont des desmosomes modifiés par ancrage à l'enveloppe cornée et intégration de la cornéodesmosine (voir paragraphe **1.2.1. Desmosomes, cornéodesmosomes et hémidesmosomes**) (Ishida-Yamamoto 2015).

L'espace intercellulaire entre les cornéocytes est rempli de lipides, libérés lors de l'exocytose des corps lamellaires, et organisés en une matrice de bicouches lipidiques qui participe à l'étanchéité de l'épiderme (Menon 2012). Les principaux lipides présents dans la couche cornée sont les céramides (50%), le cholestérol (25%) et les acides gras (10 à 20%) (Brogden 2012). Certains lipides extracellulaires sont liés de façon covalente à l'enveloppe cornée, assurant une forte cohésion de la couche cornée.

Le phénomène de desquamation fait suite à la digestion des céramides et des cornéodesmosomes par les hydrolases acides libérées lors de l'exocytose des corps lamellaires (Ishida-Yamamoto 2015).

1.2. Jonctions intercellulaires dans l'épiderme

Différents types de jonctions sont établis entre les kératinocytes et assurent des rôles spécifiques dans l'épiderme. Les jonctions d'ancrage, à savoir les hémidesmosomes, desmosomes, cornéodesmosomes et jonctions adhérentes, assurent la cohésion de l'épiderme. Les jonctions communicantes permettent d'établir la communication via le passage direct de molécules ou de nutriments entre cellules adjacentes. Enfin, les jonctions étanches assurent l'étanchéité de l'épiderme et contrôlent les flux paracellulaires de matière.

1.2.1. Desmosomes, cornéodesmosomes et hémidesmosomes

Les desmosomes permettent de relier les filaments intermédiaires de kératine de deux kératinocytes adjacents via un complexe comprenant des protéines d'adhérence cellulaire et des protéines de liaison (**Figure 3**) (Garrod 2008, Kowalczyk 2013). Les protéines d'adhérence sont des protéines transmembranaires et s'associent via leur domaine extracellulaire avec leur homologue présent en surface des cellules voisines. La région extracellulaire où les protéines d'adhérence se rejoignent est appelée la « desmoglée ». Le domaine intracellulaire des protéines d'adhérence est quant à lui intégré dans la plaque desmosomale où les protéines de liaison permettent le recrutement des filaments intermédiaires de kératine. Les desmosomes, présents dans toutes les couches vivantes de l'épiderme, sont particulièrement abondants entre les kératinocytes de la couche épineuse et sont responsables de la résistance mécanique de l'épiderme.

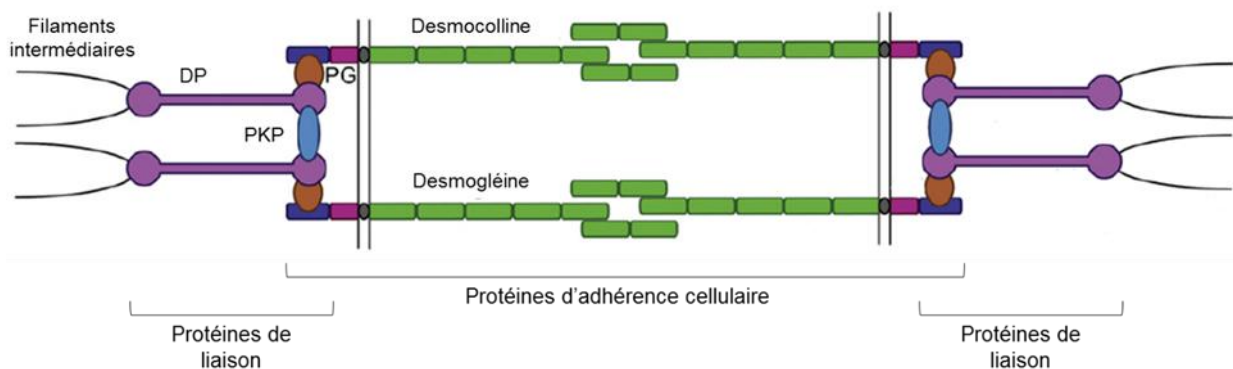


Figure 3 : Structure des desmosomes constitués de protéines transmembranaires d'adhérence cellulaire, desmocolline et desmogleïne, s'associant avec leur homologue en surface d'une cellule adjacente, et de protéines intracellulaires de liaison, plakoglobine (PG), desmoplakine (DP) et plakophilines (PKP), permettant le recrutement des filaments intermédiaires de kératine (image retravaillée à partir de Kowalczyk 2013).

Les protéines d'adhérence cellulaire sont les desmogleïnes et les desmocollines. Il existe chez l'homme quatre desmogleïnes (DSG1-4) et trois desmocollines (DSC1-3) dont le profil d'expression dans l'épiderme dépend du stade de différenciation des kératinocytes (Brandner 2010). Ainsi les DSG2 et 3 qui sont présentes dans la couche basale de l'épiderme sont remplacées par les DSG1 et 4 dans les couches supra-basales, en même temps que la DSC1 prend la place de la DSC3. Ce changement d'expression des protéines d'adhérence cellulaire coïncide avec un renforcement de la stabilité mécanique des desmosomes.

Les protéines de liaison sont quant à elles intracellulaires et permettent de maintenir la structure des desmosomes et d'y associer les filaments intermédiaires de kératine. La plakoglobine (PG) se lie au domaine intracellulaire des DSG et DSC et à la desmoplakine (DP) qui est capable de recruter les filaments de kératine. Les plakophilines (PKP), dont il en existe trois chez l'homme, interagissent avec la DP et permettent de relier latéralement DSG et DSC afin de former un desmosome stable et fonctionnel. Cet enchevêtrement complexe de protéines forme la plaque desmosomale qui apparaît dense en microscopie électronique (Kowalczyk 2013).

A la transition entre les couches granuleuse et cornée, la morphologie des desmosomes subit des modifications : ancrage de la plaque desmosomale à l'enveloppe cornée et intégration d'une nouvelle protéine, la cornéodesmosine (CDSN) (Ishida-Yamamoto 2015). Ces desmosomes modifiés, appelés cornéodesmosomes, sont responsables de l'adhérence intercellulaire des cornéocytes. La CDSN est une glycoprotéine synthétisée par les kératinocytes de la couche granuleuse et emballée dans les corps lamellaires (Haftik 1997, Jonca 2011). Après exocytose de ceux-ci, elle est incorporée à la structure des desmosomes juste avant leur conversion en cornéodesmosomes. Elle est présente dans la desmogleine tout en étant reliée de manière covalente à l'enveloppe cornée (Simon 1997). La CDSN présente des propriétés adhésives homophiles (Jonca 2002, Caubet 2004a) et serait donc une protéine d'adhérence cellulaire responsable, en coopération avec la DSG1 et la DSC1, de la cohésion des cornéocytes. De fait, des souris déficientes pour le gène encodant la CDSN montrent un décollement de la couche cornée de l'épiderme et meurent rapidement après la naissance, confirmant que la CDSN est indispensable à l'intégrité de l'épiderme (Leclerc 2009).

La dégradation des cornéodesmosomes, et particulièrement des protéines d'adhérence, est un prérequis à la desquamation normale des cornéocytes (Lundström 1988, Lundström 1990, Lundström 1994). Ainsi la CDSN est séquentiellement protéolysée au fur et à mesure que les cornéocytes migrent vers la surface cutanée (Simon 2001). Les hydrolases acides de la famille des kallikréines (KLK) sont impliquées dans ce processus et notamment la KLK5, capable de cliver la CDSN, la DSG1 et la DSC1, et la KLK7 active envers la CDSN et la DSC1 (Caubet 2004b).

Les hémidesmosomes sont les jonctions permettant l'adhérence des kératinocytes à la lame basale (Nievers 1999). Ils sont donc localisés exclusivement dans les kératinocytes de la couche basale et permettent l'établissement d'un lien structurel entre matrice extracellulaire et filaments intermédiaires de kératine. Tout comme les desmosomes, ils sont composés d'une plaque intracellulaire permettant le recrutement des filaments de kératine et de protéines transmembranaires, les intégrines, responsables de l'ancrage à la lame basale.

1.2.2. Jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont présentes dans toutes les couches vivantes de l'épiderme et sont des jonctions complexes qui peuvent prendre différentes formes. Dans la majorité des cas, elles connectent les microfilaments d'actine de deux cellules adjacentes via le complexe formé par les cadhérines et les caténines (**Figure 4**) (Hartsock 2008, Meng 2009, Brandner 2010). Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires qui s'associent avec les cadhérines présentes en surface des cellules voisines via leur domaine extracellulaire. Les caténines sont quant à elles des protéines intracellulaires qui assurent la liaison des microfilaments d'actine aux jonctions adhérentes. Ainsi la β -caténine se lie au domaine intracellulaire des cadhérines et à l' α -caténine qui est responsable du recrutement des microfilaments d'actine via des protéines intermédiaires telles que l'EPLIN.

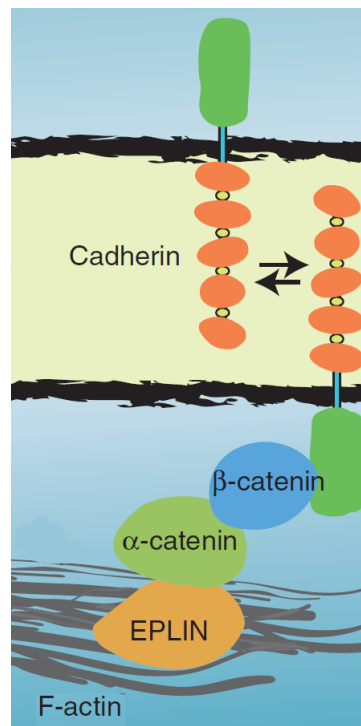


Figure 4 : Structure des jonctions adhérentes formées par l'association des domaines extracellulaires des protéines transmembranaires cadhérines de deux cellules adjacentes. En intracellulaire, les cadhérines sont reliées aux microfilaments d'actine via les caténines et d'autres protéines intermédiaires telles que l'EPLIN (Meng 2009).

1.2.3. Jonctions communicantes

Les jonctions communicantes, présentes dans toutes les couches vivantes de l'épiderme, consistent en des canaux intercellulaires permettant le passage d'ions et de petites molécules entre des cellules adjacentes sans passer par l'espace extracellulaire (**Figure 5**) (Mese 2007, Goodenough 2009). Elles sont formées par les connexines qui sont des protéines transmembranaires se regroupant par six pour former un « demi-canal » appelé le connexon. Les connexons de deux cellules voisines vont alors s'associer pour former un canal reliant les cytoplasmes de ces deux cellules. Ces canaux intercellulaires sont variables du point de vue de leur taille et de leur polarité, en fonction des connexines qui le composent, ce qui sous-entend une spécificité des molécules aptes à les traverser.

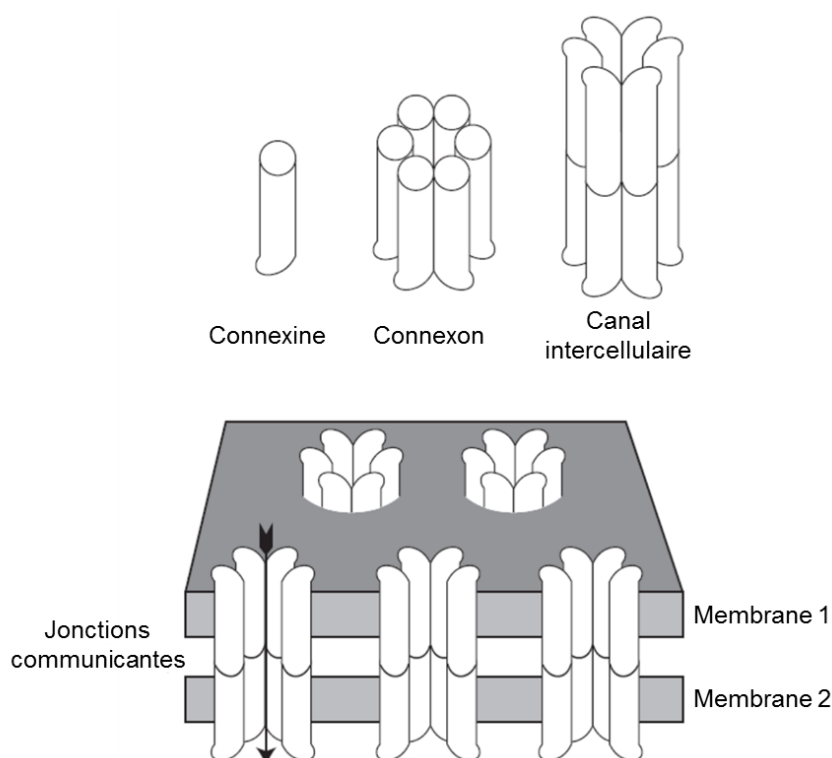


Figure 5 : Structure des jonctions communicantes consistant en un canal intercellulaire constitué par l'association de deux « demi-canaux », les connexons, présents dans les membranes cellulaires de deux cellules voisines et eux-mêmes formés par l'assemblage de six protéines transmembranaires appelées les connexines (Goodenough 2009).

1.2.4. Jonctions étanches

Les jonctions étanches (TJ pour *tight junction*) sont des jonctions intercellulaires complexes établies entre les membranes latérales des kératinocytes de la couche granuleuse (Brandner 2002, Yoshida 2013). Elles forment une barrière continue, la « barrière étanche », entre la couche cornée et les couches sous-jacentes de kératinocytes vivants et contrôlent les flux paracellulaires de molécules de part et d'autre (Kirschner 2010). De par leur localisation restreinte à l'extrémité apicale des membranes latérales des kératinocytes, les TJ jouent aussi un rôle dans la polarisation cellulaire en séparant les membranes apicale et basolatérale (Kuroda 2010). Les TJ sont également présentes dans les follicules pileux et les glandes sudoripares suggérant que la barrière étanche est continue dans la peau (Brandner 2016).

Les TJ sont composées par l'association de protéines transmembranaires et de protéines de plaque (**Figure 6A**) (Bäsler 2016, Brandner 2016). Les protéines transmembranaires sont responsables de la jonction entre deux cellules voisines à proprement parlé et comprennent la famille des claudines (cldn), l'occludine (ocln) et les protéines JAM (*junctional adhesion molecules*). Les protéines de plaque sont quant à elles nécessaires pour le recrutement des protéines cytoplasmiques et pour l'ancrage des jonctions aux microfilaments d'actine. Il s'agit par exemple des protéines ZO-1, ZO-2, ZO-3 (*protein zonula occludens*), de la cinguline et de la protéine MUPP-1 (*multi-PDZ protein-1*). Concrètement, les protéines transmembranaires de deux cellules adjacentes s'associent en rapprochant les membranes pour sceller l'espace intercellulaire. La jonction étanche ainsi formée comprend dans sa structure des pores aqueux

et des canaux permettant le passage paracellulaire d'eau, d'ions et de molécules de façon contrôlée (**Figure 6B**) (Brandner 2007). En effet, la composition des TJ, et surtout le choix des claudines, module le flux paracellulaire en créant des canaux sélectifs pour des molécules de taille ou de charge spécifique (Van Itallie 2006).

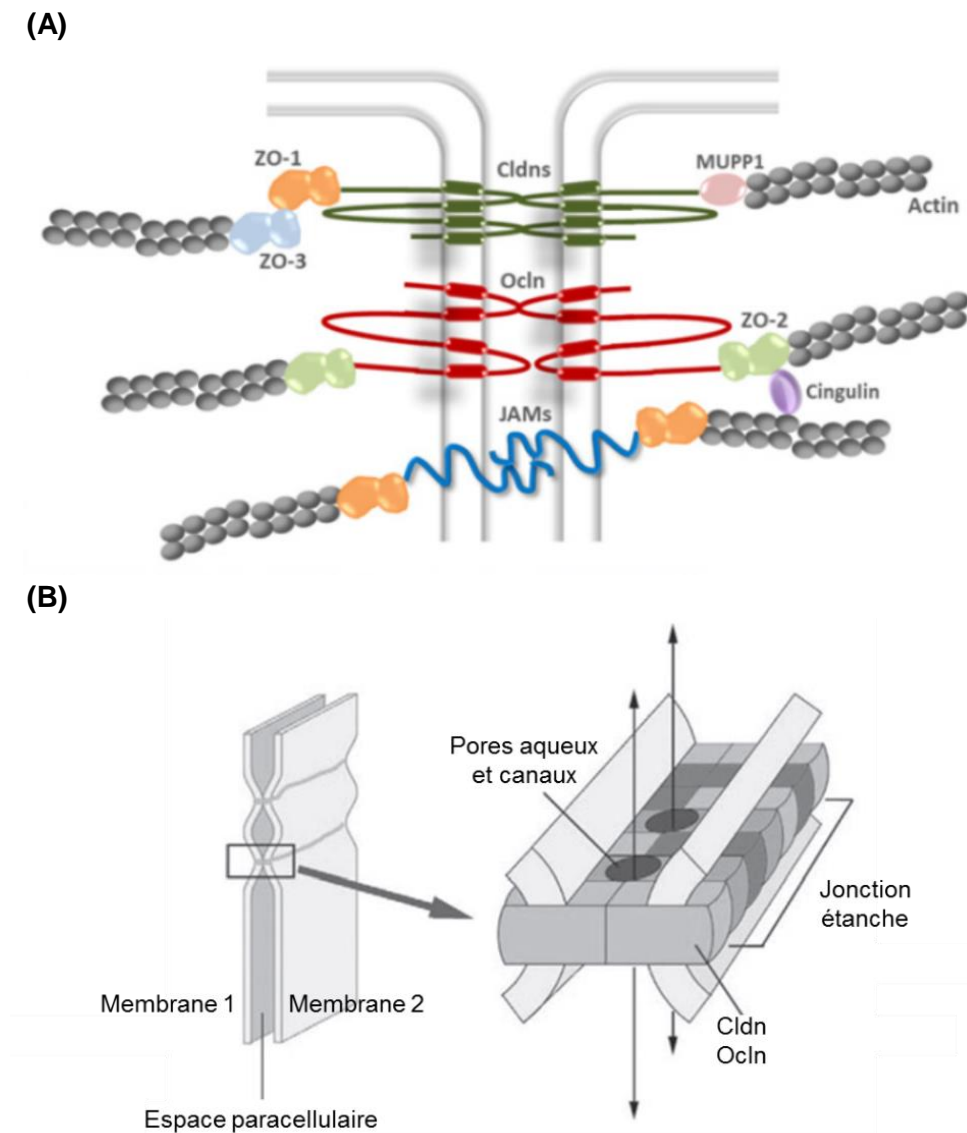


Figure 6 : (A) Structure des jonctions étanches formées par l'association des protéines transmembranaires, claudines (cldn), occludine (ocln) et protéines JAM (*junctional adhesion molecules*), de deux cellules adjacentes et par leur maintien et ancrage aux filaments d'actine par les protéines de plaque, telles les protéines ZO-1 à ZO-3 (*zonula occludens*), la protéine MUPP1 (*multi-PDZ protein-1*) et la cinguline (Bäsler 2016). (B) Barrière étanche formée par le rapprochement des membranes plasmiques de deux cellules voisines au niveau des jonctions étanches. La formation de pores aqueux et de canaux permet aux jonctions étanches de contrôler les flux paracellulaires (Brandner 2007).

1.3. Barrières épidermiques

L'une des principales fonctions de la peau est de contrôler les échanges entre l'organisme et l'environnement extérieur. C'est majoritairement l'épiderme qui assure ce rôle de barrière grâce à ses caractéristiques physico-chimiques. On parle donc de la barrière épidermique qui est en réalité elle-même composée de l'action simultanée des barrières physique, chimique, et immunologique sans oublier le microbiome présent en surface de la peau (Proksch 2008).

La barrière physique de l'épiderme est constituée par la rigidité mécanique de la couche cornée et par les jonctions étanches qui représentent un obstacle physique à l'encontre du passage de matière, qu'il s'agisse de composés chimiques ou de micro-organismes. Etant une structure continue, la matrice lipidique représente la principale voie d'entrée et de sortie paracellulaire des substances à travers la couche cornée et fait donc partie intégrante de la barrière physique de l'épiderme (Van Smeden 2016). Elle serait notamment d'une grande importance dans l'établissement de la barrière contre la perte d'eau (Micali 2001).

Comme signalé au paragraphe **1.2.4. Jonctions étanches**, les TJ forment une barrière étanche au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme, séparant physiquement la couche cornée des couches sous-jacentes de kératinocytes vivants. L'importance des TJ dans l'établissement de la barrière épidermique a été démontrée par le fait que des souris déficientes en *cldn-1* meurent dès leur premier jour de vie suite à une perte d'eau incontrôlable (Furuse 2002). De nombreuses expériences ont confirmé l'implication des TJ dans l'établissement d'une barrière interne-externe. En effet, la progression vers la surface cutanée par voie paracellulaire de la biotine (557 Da), injectée dans le derme de souris, est stoppée au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme par les TJ (Furuse 2002). Ce blocage de la biotine par les TJ a également été montré sur un modèle d'explant cutané humain (Kirschner 2010). Plus tôt, l'arrêt de la migration de l'ion lanthanum au niveau de la couche granuleuse avait déjà été observé dans des biopsies de peau humaine (Hashimoto 1971). Par ailleurs, les TJ assurent aussi un rôle de barrière externe-interne. De fait, les TJ forment une barrière partielle contre le passage des ions Na^+ , Cl^- et Ca^{2+} ainsi que de l'eau et de traceurs moléculaires d'une taille allant de 300 Da à 40 kDa, appliqués de manière topique sur des kératinocytes humains en monocouche (Kirschner 2013). Les TJ forment donc une barrière dans les deux sens, contrôlant le passage paracellulaire de solutés suivant leur gradient de concentration.

La barrière chimique de l'épiderme est obtenue principalement par le pH acide de la peau, qui varie entre 4,2 et 5,6 (Brogden 2012) et par le sébum. Le sébum est produit par les glandes sébacées qui sont présentes sur toute la surface de la peau, à l'exception des paumes des mains et de la plante des pieds, et est composé chez l'homme majoritairement de triglycérides et d'acides gras (Botek 2001). Une fois sécrété, le sébum se répartit sur la surface cutanée et y forme une couche protectrice. Il est ainsi impliqué dans l'isolation thermique, dans l'imperméabilité de la peau, participant avec la matrice lipidique de la couche cornée au contrôle de la perte d'eau, et dans la défense de l'organisme contre les infections. Les peptides antimicrobiens, décrits en détails au paragraphe **1.3.1. Peptides antimicrobiens**, font également partie de la barrière chimique de l'épiderme.

Les cellules de Langerhans, qui sont des cellules présentatrices d'antigène localisées dans l'épiderme, et les cytokines produites par les kératinocytes composent la barrière immunologique. L'implication du système immunitaire dans la défense cutanée contre la dermatophytose est décrite en détail au paragraphe **3.2. Immunité anti-dermatophytes**.

Le microbiome comprend l'ensemble des micro-organismes commensaux qui colonisent la surface de la peau. Ces micro-organismes participent à la défense de l'organisme contre les infections par des agents pathogènes via plusieurs mécanismes dont la compétition pour l'occupation de la surface cutanée et pour les nutriments et la production de molécules bactéricides ou fongicides. Le microbiome et sa participation à la barrière épidermique est décrit plus en détail au paragraphe **1.3.2. Microbiome**.

1.3.1. Peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont des petits peptides de 5 à 200 acides aminés caractérisés par leur capacité à inhiber la croissance des micro-organismes (Braff 2005b, Clausen 2016). Ils sont principalement exprimés par les cellules épithéliales présentes dans les organes et tissus en contact avec l'environnement extérieur, notamment la peau, le tractus gastro-intestinal et le système respiratoire, soit de manière constitutive soit en réponse à la présence d'un agent pathogène ou à l'inflammation (Ganz 2003, Bahar 2013). Dans la peau, les PAM sont produits par les kératinocytes et empaquetés dans les corps lamellaires afin de permettre leur transport vers la couche cornée (Oren 2003, Braff 2005a). Les PAM font ainsi partie de la barrière épidermique et de l'immunité innée (Izadpanah 2005).

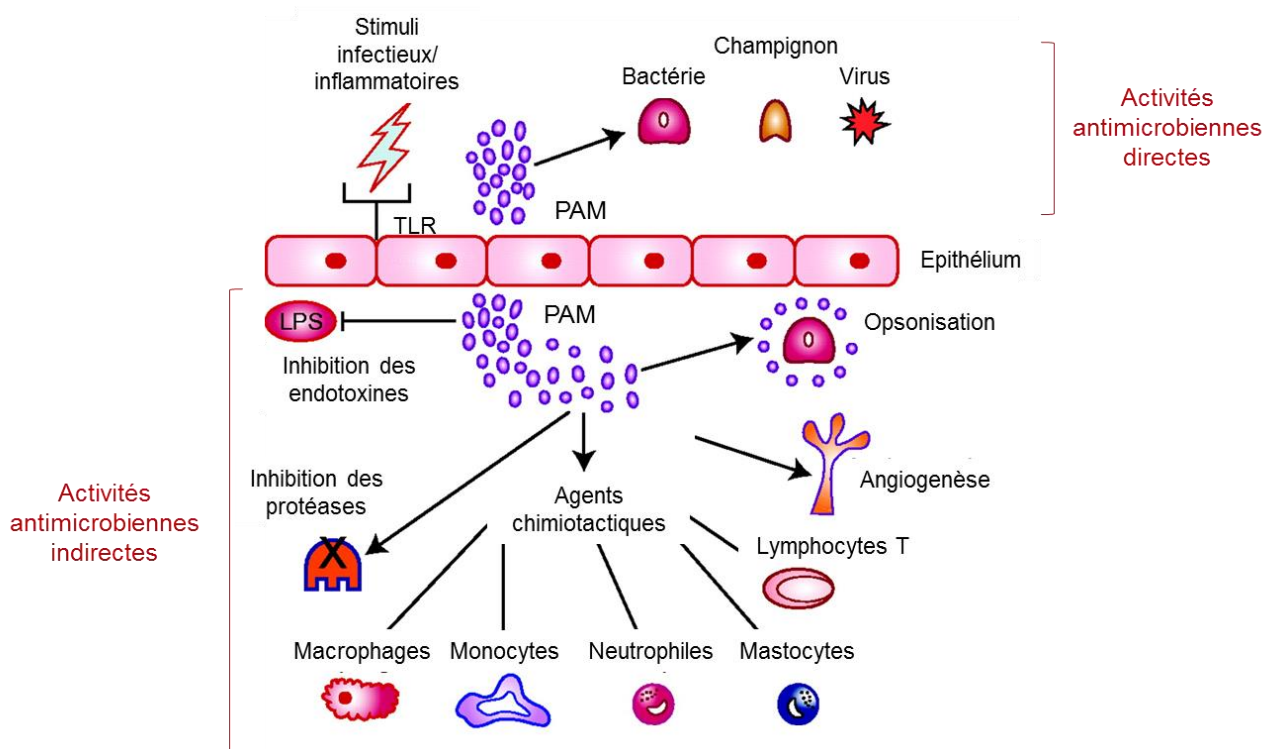


Figure 7 : Les peptides antimicrobiens produits par les cellules épithéliales participent à la défense contre les micro-organismes pathogènes via des activités antimicrobiennes directes et indirectes (Frew 2011).

Les PAM sont efficaces contre les bactéries, les virus, les levures, les parasites et les champignons par des effets microbicides directs et par des effets indirects (**Figure 7**) (Frew 2011, Brogden 2012). De manière directe, ils sont capables de désorganiser la membrane cellulaire de l'agent infectieux et/ou d'interférer avec les processus intracellulaires de celui-ci, comme la réplication de l'ADN ou la synthèse des protéines (Bahar 2013). De manière indirecte, les PAM sont capables d'immuno-modulation et jouent un rôle important dans la transition vers l'immunité adaptative (Ganz 2003). De fait, ils sont des agents chimiotactiques pour les cellules immunitaires et peuvent induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou de chémokines par les cellules immunitaires ou épithéliales. Les PAM sont également impliqués dans d'autres mécanismes, tels l'opsonisation des agents pathogènes, l'inhibition des endotoxines et protéases microbiennes et l'angiogenèse (Frew 2011).

Actuellement, 2184 PAM ont été identifiés dans le règne animal, dont 123 chez l'homme². Parmi ces nombreux PAM, les défensines, la cathélicidine LL-37, la protéine S100A7 et la ribonucléase-7 sont les plus étudiés.

Les défensines sont des peptides cationiques, contenant entre 36 et 45 acides aminés et caractérisés par la présence de 3 ou 4 ponts disulfures entre résidus cystéine dont la position permet de différencier les α -défensines des β -défensines (Brogden 2012, Clausen 2016). Les α -défensines sont présentes dans les granules des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et exprimées par les cellules de Paneth au niveau de l'intestin et par les cellules épithéliales du tractus urogénital femelle. Les β -défensines sont quant à elles produites par les cellules épithéliales, les PMN, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T (Braaf 2005b). Les β -défensines-1 (hBD1), -2 (hBD2) et -3 (hBD3) sont les plus étudiées et les plus abondantes. Alors que la hBD1 est constitutivement exprimée par les kératinocytes, l'expression des hBD2 et hBD3 est induite par la présence d'agents pathogènes ou de cytokines pro-inflammatoires via une signalisation faisant intervenir les *toll-like receptor* (TLR) (Vora 2004, Schlee 2007). La hBD2 est également exprimée par les sébocytes dans les glandes sébacées et prend part à la composition du sébum (Nakatsuji 2010).

Les β -défensines possèdent une activité microbicide directe contre les bactéries, les champignons et les virus (Fritz 2012, Semple 2012). Toutefois, le mode d'action exact par lequel elles provoquent la mort de ces micro-organismes n'est pas connu. Une étude a montré que la hBD3 interférait avec la biosynthèse de la paroi cellulaire des bactéries du genre *staphylocoque* (Sass 2010). Une autre étude a démontré que le site initial de l'action microbicide des hBD1, hBD2 et hBD3 contre la levure *Candida albicans* était également la membrane cellulaire (Krishnakumari 2009). Cependant il n'est pas clairement établi si les β -défensines désorganisent la membrane ou pénètrent à l'intérieur des levures pour interférer avec des mécanismes intracellulaires. En outre, les β -défensines sont des facteurs chimiotactiques pour les lymphocytes T et les cellules dendritiques (Yang 1999) et peuvent induire la production de cytokines et de chémokines par les kératinocytes (Niyonsaba 2007).

Les gènes encodant les β -défensines font partie du cluster DEFB (*defensin beta*) et sont des gènes soumis à la variation du nombre de copies, allant de 2 à 12 copies par génome diploïde, et reflétant directement le taux d'expression basale des protéines qu'ils encodent (Hollox 2003). Le gène DEFB4, qui encode la hBD2, a été associé à de nombreuses maladies inflammatoires et infectieuses. Ainsi un nombre de copies élevé du gène DEFB4 favorise le

² The Antimicrobial Peptide Database, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, consulté le 16/02/2018

développement du psoriasis (Hollox 2008). Ceci serait expliqué par les propriétés pro-inflammatoires de la hBD2 qui, accumulée de manière trop importante après une blessure ou une infection, serait à l'origine d'une réponse inflammatoire inappropriée conduisant à terme à des lésions psoriatiques. A l'inverse, un faible nombre de copies du gène DEFB4 serait un facteur de risque pour des maladies d'origine infectieuse comme la parodontite chronique (Jaradat 2013) ou le cancer du col de l'utérus (Abe 2013).

La cathélicidine humaine LL-37 est exprimée par les PMN, les macrophages et les cellules épithéliales en réponse à l'infection par un agent pathogène ou à l'inflammation (Brogden 2012, Clausen 2016). Dans la peau, elle est produite dans l'épiderme par les kératinocytes mais également dans les glandes sudoripares eccrines, depuis lesquelles elle est sécrétée dans la sueur (Braff 2005b). La LL-37 possède une activité antimicrobienne à large spectre et de nombreuses fonctions immuno-modulatrices (Brogden 2012). Elle peut former des pores et désintégrer les membranes bactériennes, inhiber la synthèse d'ARN et de protéines chez les bactéries et inactiver les endotoxines. Elle est aussi un agent chimiotactique pour les PMN, macrophages et lymphocytes, est capable d'induire la production de cytokines et de chémokines par les cellules épithéliales et de réguler la différenciation des cellules dendritiques (Izadpanah 2005). Enfin, la LL-37 prend part à l'angiogenèse et à la ré-épithélialisation de la peau après une blessure.

La protéine S100A7, anciennement appelée psoriasine, est présente à un niveau basal faible dans l'épiderme sain mais son expression est stimulée rapidement en cas d'infection ou d'inflammation (Schröder 2006). Elle agit comme un agent chimiotactique pour les lymphocytes T et les PMN et est également capable de stimuler l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines par les kératinocytes et les PMN (Brogden 2012).

La ribonucléase-7 (RNase 7) est exprimée de manière constitutive dans les épithéliums et dans la peau (Brogden 2012). Ce peptide est également présent dans le tractus urogénital et serait en grande partie responsable de la stérilité de l'urine via une action microbicide sur les agents pathogènes par désorganisation des membranes (Spencer 2013).

1.3.2. Microbiome

La peau est colonisée par une grande diversité de micro-organismes, incluant des bactéries, des champignons, des virus et des parasites, qui forment le microbiome dont la composition et la concentration dépendent de la localisation anatomique (Grice 2011, Zeeuwen 2013, Prescott 2017). La peau présente en effet des caractéristiques variables en termes d'épaisseur, de température, d'humidité et de densité en annexes cutanées qui favorisent ou non la croissance de certains types de micro-organismes. Des facteurs liés à l'hôte, tel l'âge, le sexe ou la génétique, de même que les habitudes comportementales, comme le choix des vêtements ou l'utilisation de cosmétiques, et des facteurs environnementaux, dont l'exposition aux UV, influencent également le microbiome. Globalement, entre 100 et 1.000.000 de micro-organismes colonisent chaque centimètre carré de la peau humaine (Grice 2008), *Staphylococcus epidermidis* étant la bactérie la plus répandue (Grice 2011) alors que les *Malassezia* représentent jusqu'à 80% de la population fongique commensale (Paulino 2008). Il est communément admis que la surface de la peau est de 2 m², cependant ce chiffre ne prend pas en compte les follicules pileux et les annexes

cutanées qui représentent pourtant des niches accessibles aux micro-organismes. Lorsqu'on considère le microbiome, la surface cutanée à prendre en compte est dès lors de plus de 30 m² (Gallo 2017).

Les micro-organismes du microbiome sont inoffensifs en conditions normales et certains sont même bénéfiques puisqu'ils protègent l'hôte contre l'invasion par des organismes pathogènes et dommageables (Sanford 2014). Par exemple, la croissance de la bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* inoculée sur un modèle d'épiderme humain reconstruit est diminuée par l'infection préalable par la bactérie commensale *S. epidermidis* (Bäsler 2017). De manière indirecte, les micro-organismes commensaux entrent en compétition avec les organismes pathogènes pour l'occupation de l'espace et pour la consommation des nutriments. Ils peuvent aussi rendre l'environnement hostile pour les organismes pathogènes en influençant le pH de la peau. De manière plus directe, de nombreuses bactéries commensales sont capables de produire des substances antimicrobiennes inhibant la croissance d'autres micro-organismes potentiellement pathogènes. Par exemple, certains isolats cliniques de *S. epidermidis* produisent des protéases qui inhibent la formation de biofilms et la colonisation par *S. aureus* (Iwase 2010).

Les micro-organismes commensaux de la peau jouent un rôle dans la modulation et dans l'éducation des systèmes immunitaires inné et adaptatif (Belkaid 2014). Ils sont capables de moduler l'environnement immunitaire par induction de l'expression de PAM (Lai 2010) ou de cytokines (Naik 2012, Yuzhakova 2016). La fonction des lymphocytes T étant grandement influencée par le milieu immun local, le microbiome peut ainsi orienter l'activation des lymphocytes T présents dans le derme. La présence de ces micro-organismes non-pathogènes permet aussi un entraînement des cellules immunitaires locales à reconnaître les motifs microbiens. L'importance du microbiome dans la régulation de l'immunité a été démontrée par le fait qu'une diminution de la diversité du microbiome influençait le développement de maladies cutanées inflammatoires ou infectieuses. Par exemple, une réduction de l'abondance de la bactérie commensale *S. epidermidis* chez l'enfant augmente les risques de développement de la dermatite atopique (Kennedy 2017).

Toutefois, malgré l'action globalement bénéfique du microbiome, il faut garder à l'esprit que ces micro-organismes peuvent devenir pathogènes en fonction du contexte, incluant le statut immunitaire de l'hôte, certaines prédispositions génétiques et l'intégrité de la barrière épidermique (Chen 2018). De même, une activation trop importante du système immunitaire par le microbiome pourrait être dommageable pour l'organisme hôte. Les TJ de l'épiderme permettent une séparation physique entre les micro-organismes commensaux localisés en surface de la peau et les composants immunitaires présents dans le tissu sous-jacent et limitent donc les contacts entre ces deux compartiments (Brandner 2016). De plus, l'expression basale de PAM et de cytokines ainsi que l'activation des lymphocytes T induites par le microbiome permettent non seulement de protéger l'hôte contre l'invasion par des micro-organismes pathogènes mais participent également au contrôle de la propagation et de la prolifération des micro-organismes commensaux de la peau (Belkaid 2014).

1.3.3. Interactions des barrières épidermiques

Les différentes barrières de l'épiderme interagissent les unes avec les autres dans le but d'optimiser leur fonction commune, à savoir la protection de l'organisme contre les agressions extérieures et le contrôle de la perte d'eau (Brandner 2016).

Premièrement, il semble exister un mécanisme compensatoire au sein de la barrière physique de l'épiderme, les TJ étant renforcées en cas de perturbation de la couche cornée. De fait, il a été montré que des altérations de la couche cornée par « *tape stripping* », consistant à éliminer les couches superficielles de cornéocytes à l'aide de bandes adhésives, induisaient une augmentation de l'expression des protéines des TJ (Baek 2013). De même, dans les peaux non-lésionnelles de patients atteints de dermatite atopique, connue pour altérer la couche cornée, une surexpression de la *cldn-4* est observée (Gruber 2015). A l'inverse, un déficit des TJ induirait des altérations de la couche cornée. Ainsi l'absence de *cldn-1* dans des cultures de kératinocytes humains invalidés par interférence ARN, induit une modification des niveaux d'expression de l'involucrine et de la loricrine, toutes deux impliquées dans la formation de l'enveloppe cornée (Kirschner 2013). De plus, dans un modèle de souris invalidées (KO pour *knockout*) pour la *cldn-1*, des altérations de la filaggrine et des changements dans la composition de la matrice lipidique sont observés (Sugawara 2013).

Une collaboration existe entre les barrières physique et immunitaire de l'épiderme. Les cellules de Langerhans expriment les protéines des TJ et peuvent donc établir des jonctions étanches fonctionnelles avec les kératinocytes, ce qui leur permet de collecter des antigènes au-delà de la barrière étanche sans compromettre celle-ci (Kubo 2009). De même, l'expression des protéines des TJ est diminuée en présence des PMN pour permettre leur transmigration vers la surface de la peau (Kirschner 2009). Par ailleurs, diverses cytokines ont un impact sur la barrière physique de l'épiderme. Ainsi, l'interleukine (IL)-1 β et le *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) peuvent influencer le niveau d'expression et la localisation des protéines des TJ (Kirschner 2009) tandis que l'IL-1, le TNF α , l'IL-6 et l'interféron gamma (IFN γ) sont capables de stimuler la synthèse des lipides et de modifier la composition de la matrice lipidique dans la couche cornée (Proksch 2008, Van Smeden 2016). Dans l'autre sens, une perturbation de la barrière physique par « *tape stripping* » ou par traitement au SDS (*sodium dodecyl sulfate*) induit une augmentation de l'expression de l'IL-1 α et de l'IL-1 β (de Koning 2011). Il semble donc qu'il existe un mécanisme en boucle par lequel une altération de la barrière physique entraîne la production de cytokines participant à sa restauration.

Les PAM, appartenant à la barrière chimique de l'épiderme, possèdent une influence positive sur les jonctions étanches. Une augmentation de l'expression des protéines des TJ par des kératinocytes humains en monocouche, ainsi qu'une augmentation de la TEER (résistance électrique transépithéliale) et une diminution de la perméabilité épidermique, ont en effet été mises en évidence après traitement par la hBD3 et la protéine S100A7 (Hattori 2014, Kiatsurayanon 2014). La libération des PAM en réponse à une infection permettrait dès lors de renforcer la barrière physique de l'épiderme afin de ralentir la progression des agents pathogènes. A l'inverse, des perturbations de la barrière physique de l'épiderme par « *tape stripping* » ou par le SDS entraînent une augmentation de l'expression de différents PAM dont hBD2, hBD3, RNase7 et protéine S100A7 (Gläser 2009, Harder 2010, de Koning 2011).

Enfin, le microbiome influence les TJ. En effet, la colonisation d'explants cutanés de porc ou de kératinocytes humains en culture monocouche par la bactérie commensale *S. epidermidis* résulte en une augmentation de l'expression des protéines des TJ et en une augmentation de la TEER (Ohnemus 2008). Le microbiome influence également la barrière chimique de l'épiderme. De fait, il a été montré que la présence de *S. epidermidis* résultait en une augmentation de l'expression des PAM hBD2 et hBD3 par des kératinocytes humains en culture (Lai 2010). Le microbiome est également associé à l'expression constitutive de $\text{TNF}\alpha$ (Yuzhakova 2016) et d'IL-1 α (Naik 2012) dans la peau de souris adulte.

1.4. Epiderme humain reconstruit

Un modèle *in vitro* d'épiderme humain reconstruit (RHE) a été mis au point au Laboratoire de Cellules et Tissus (URPHYM) de l'UNamur (Poumay 2004, Frankart 2012a, De Vuyst 2014). Brièvement, des kératinocytes humains normaux sont isolés à partir d'échantillons de peau humaine, obtenus à la suite d'abdominoplastie. Ces kératinocytes primaires sont alors cultivés à l'interface air-liquide dans un milieu adéquat contenant notamment du KGF (*Keratinocyte Growth Factor*), des ions Ca^{2+} , indispensables à l'établissement des jonctions intercellulaires de l'épiderme, et de la vitamine C, nécessaire à la production des céramides. Au terme de 11 jours de culture, les kératinocytes ont formé un tissu qui présente des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles semblables à celles d'un épiderme humain *in vivo*. L'analyse histologique révèle en effet la présence des quatre couches caractéristiques de l'épiderme (**Figure 8**). De plus, la distribution des marqueurs de différenciation épidermiques, évaluée par immunomarquage, est comparable à celle observée dans l'épiderme *in vivo* (Poumay 2004, Frankart 2012a). Enfin, l'établissement d'une barrière fonctionnelle par les RHE a pu être démontré par mesure de la TEER (Frankart 2012a).

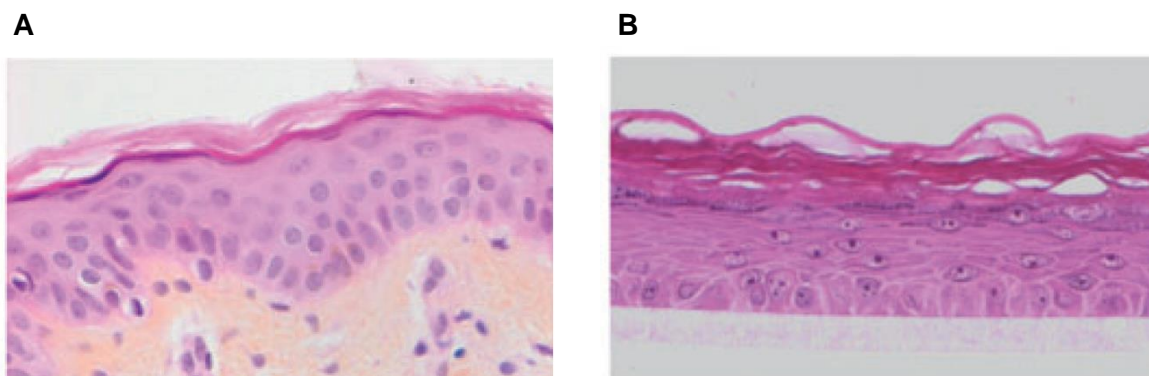


Figure 8 : Analyse morphologique **(A)** de la peau normale humaine ou **(B)** d'un épiderme humain reconstruit au 11^e jour de reconstruction après coloration par l'HE (Hémalun Erythrosine) (Frankart 2012a).

Le modèle de RHE offre des possibilités énormes en ce qui concerne l'étude de la physiologie normale et pathologique de l'épiderme. Notamment, ce modèle a permis d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en place par les kératinocytes en réaction à la présence de substances sensibilisantes, mimant l'induction d'une allergie de contact (Frankart 2012b). Le métabolisme de l'acide hyaluronique, qui est un glycosaminoglycane et l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire de l'épiderme, a également été investigué en utilisant le modèle de RHE (Malaisse 2014).

Par ailleurs, il a été possible de reconstruire un épiderme *in vitro* à partir de kératinocytes provenant d'un patient souffrant de la maladie de Darier (Lambert de Rouvroit 2013, De Vuyst 2014). Cet épiderme reconstruit présentait des caractéristiques morphologiques associées à la maladie de Darier et semble dès lors être un bon outil pour l'étude des mécanismes liés à cette maladie. Enfin, le traitement des RHE par la méthyl- β -cyclodextrine associé à un mélange d'interleukines a permis de reproduire les altérations principales associées à la dermatite atopique (De Vuyst 2016a, De Vuyst 2016b, do Nascimento Pedrosa 2017).

2.Dermatophytes et dermatophytoses

2.1. Généralités

Les dermatophytoses, aussi appelées « teignes », sont des infections superficielles des structures kératinisées de l'organisme, à savoir les cheveux, les ongles et la couche superficielle de l'épiderme, par des champignons filamenteux kératinophiles et kératinolytiques appelés dermatophytes (Weitzman 1995). Il existe trois catégories de dermatophytes en fonction de leur hôte naturel :

- Les dermatophytes géophiles se nourrissent des débris kératinisés présents dans l'environnement et sont rarement pathogènes ;
- Les dermatophytes zoophiles sont inféodés à une ou plusieurs espèces animales mais, bien qu'ils soient mieux adaptés à leur hôte de prédilection, ils peuvent aussi infecter d'autres espèces animales, y compris l'homme ;
- Les dermatophytes anthropophiles sont quant à eux inféodés à l'homme et infectent rarement d'autres espèces animales.

Jusque dans les années 90, les dermatophytes étaient classés en espèces principalement sur base de leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques en culture et sur l'aspect clinique des lésions qu'ils provoquent (Sabouraud 1910, Emmons 1934, Weitzman 1995). Cependant, l'efficacité de ce mode de classification est limitée par le fait que des espèces différentes peuvent présenter le même aspect alors que des souches de dermatophytes provenant d'une même espèce peuvent montrer des variations morphologiques. Plus tard, l'analyse des séquences de l'ADN, en particulier les polymorphismes des régions *internal transcribed spacer* (ITS) a permis une meilleure discrimination des espèces (Gräser 1999) mais ne tenait pas compte des différences phénotypiques des dermatophytes. Ainsi certaines espèces morphologiquement et cliniquement distinctes ont été décrites comme identiques sur base de leur séquences ITS, par exemple les espèces *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton equinum* alors que celles-ci sont respectivement des espèces anthropophile et zoophile. Le manque de spécificité et de standardisation dans la classification des dermatophytes a conduit à l'émergence d'un nombre élevé de dénominations d'espèces, avec parfois plusieurs noms désignant en réalité une seule et même espèce, compliquant l'identification clinique.

Pour pallier à ce problème, la classification et la nomenclature des dermatophytes ont été revisitées en 2016 en se basant sur l'analyse des séquences d'ADN de cinq locus, dont les régions ITS, sur les caractéristiques morphologiques et physiologique en culture et sur le caractère géophile, zoophile ou anthropophile des dermatophytes (de Hoog 2017a, Monod 2017). Ainsi, les dermatophytes zoophiles et anthropophiles sont maintenant répartis en trois genres principaux qui sont *Trichophyton*, *Epidermophyton* et *Microsporum* alors que les dermatophytes géophiles et quelques dermatophytes zoophiles infectant rarement l'homme appartiennent aux genres *Nannizzia* et *Arthroderma* (de Hoog 2017b). Les principales espèces géophiles, zoophiles et anthropophiles des dermatophytes sont reprises à la **Table 1**.

Table 1 : Principales espèces géophiles, zoophiles et anthropophiles des dermatophytes dénommées selon la nouvelle nomenclature.

Espèces géophiles

Nannizia fulva (anciennement dans le complexe *Microsporum gypseum*)

Nannizia gypsea (anciennement dans le complexe *Microsporum gypseum*)

Nannizia incurvata (anciennement dans le complexe *Microsporum gypseum*)

Espèces zoophiles

Trichophyton mentagrophytes

Chien, chat, lapin

Trichophyton benhamiae (anciennement appelé *Arthroderma benhamiae*)

Cobaye

Microsporum canis

Chat, chien

Trichophyton equinum

Cheval

Espèces anthropophiles

Trichophyton rubrum

Trichophyton interdigitale

Trichophyton tonsurans

Trichophyton violaceum

Epidermophyton floccosum

Microsporum audouinii

Les dermatophytoses sont actuellement à l'origine de 3 à 4% des consultations dermatologiques et sont les mycoses les plus communes à travers le monde avec une prévalence estimée entre 20 et 25% (Seebacher 2008, Zhan 2017). Cette prévalence élevée n'a cessé d'augmenter depuis cette dernière décennie en réponse à une augmentation de la pratique sportive, de l'incidence du diabète et des maladies vasculaires et du vieillissement de la population qui sont des facteurs de risque des mycoses cutanées. De plus, les mouvements de populations, que ce soit par le tourisme ou l'immigration, entraînent l'introduction de nouvelles espèces de dermatophytes dans des zones géographiques où elles ne se trouvaient pas jusqu'alors (Havlickova 2008, Hayette 2015). Parmi les nombreuses espèces de dermatophytes capables d'infecter l'homme, l'espèce anthropophile *T. rubrum* est actuellement l'espèce prédominante, responsable de 50 à 90% des dermatophytoses humaines (Lee 2015, Zhan 2017).

Outre les problèmes de santé publique qu'elles entraînent, les dermatophytoses sont également à l'origine de coûts importants pour les assurances en soin de santé puisque plus de 500.000.000 \$ sont dépensés chaque année dans le monde pour leur prise en charge (Achtermann 2012).

2.2. Signes cliniques et lésions des dermatophytoses

L'aspect clinique des dermatophytoses résulte de la dégradation des structures kératinisées par les processus fongiques et de la réponse immunitaire de l'hôte ; ainsi, les espèces zoophiles, moins adaptées à l'homme, provoquent généralement des lésions plus inflammatoires (Degreef 2008, de Hoog 2017b). L'aspect clinique des dermatophytoses est

très variable en fonction de la zone du corps qui est touchée mais se caractérise dans la majorité des cas par de la sécheresse, de la desquamation, des fissures ou des taches érythémateuses (**Figure 9**). On distingue quatre formes principales de dermatophytose chez l'homme : la teigne corporelle, la teigne du pied, la teigne du cuir chevelu et la teigne de l'ongle. La teigne corporelle, aussi appelée « roue de Sainte-Catherine », apparaît au niveau de la peau glabre, elle prend la forme d'une lésion annulaire érythémateuse à croissance centrifuge avec un centre clair et un épaissement cutané en périphérie (**Figure 9A**). La teigne du pied, aussi connue sous le nom de « pied d'athlète », touche la plante des pieds et les espaces entre les orteils et est caractérisée par de la sécheresse, un érythème, des fissures et de la desquamation (**Figure 9B**). La teigne du cuir chevelu est provoquée par l'invasion des cheveux et des follicules pileux par les dermatophytes. Les cheveux deviennent alors cassants et une plaque d'alopécie à progression centrifuge apparaît (**Figure 9C**). Cette forme de dermatophytose peut également toucher la barbe chez l'homme. Enfin, la teigne de l'ongle, ou onyxis dermatophytique, est l'infection des ongles qui deviennent plus épais, cassants, rugueux et décolorés (**Figure 9D**). Il faut noter que d'autres champignons peuvent également infecter les ongles et provoquer des symptômes similaires. De manière générale, les infections fongiques des ongles sont dénommées « onychomycoses ».



Figure 9 : Aspect clinique des formes principales de dermatophytoses : **(A)** teigne corporelle, **(B)** teigne du pied, **(C)** teigne du cuir chevelu et **(D)** teigne de l'ongle (Degreef 2008, Avelar Pires 2014, Nenoff 2014b).

Les infections de la peau glabre et des ongles sont les infections les plus fréquentes dans les pays industrialisés et sont majoritairement dues aux espèces anthropophiles *T. rubrum* et *T. interdigitale*. Les infections du cuir chevelu sont quant à elles plus répandues dans les pays en voie de développement, où les mesures d'hygiène sont moins strictes, et sont provoquées principalement par les espèces zoophile *M. canis*, et anthropophiles *T. tonsurans* et *T. violaceum* (Zhan 2017). Par exemple, l'absence de désinfection des ustensiles utilisés dans les salons de coiffure au Mali est une cause de transmission importante (Coulibaly 2014).

Généralement, les infections par les dermatophytes sont superficielles et restent localisées dans les tissus kératinisés. Dans de rares cas, les dermatophytes peuvent toutefois envahir le derme de manière locale ; on parle alors du granulome de Majocchi. Ce type de lésion apparaît généralement chez des patients souffrant d'une dermatophytose chronique, après un trauma physique qui est responsable de l'introduction passive des éléments fongiques dans le derme (Smith 1991, Smith 2001). Dans des cas encore plus rares, et seulement chez des patients immunodéprimés, l'infection peut se disséminer dans les tissus sous-cutanés, dans les nœuds lymphatiques et finalement atteindre les organes profonds, conduisant à la mort du patient si un traitement n'est pas entamé assez rapidement (Squeo 1998, Cheng 2014).

D'un point de vue histologique, les lésions de dermatophytose cutanée sont caractérisées par la présence d'éléments fongiques (arthrospores et filaments mycéliens) dans la couche cornée (**Figure 10**) (Nenoff 2014b). De la spongiose, œdème intercellulaire, et de l'acanthose, épaissement de l'épiderme suite à l'hyperprolifération des kératinocytes, peuvent également être visibles. Chez les patients immunocompétents, il est très rare de voir des éléments fongiques envahir les couches de kératinocytes vivants de l'épiderme.

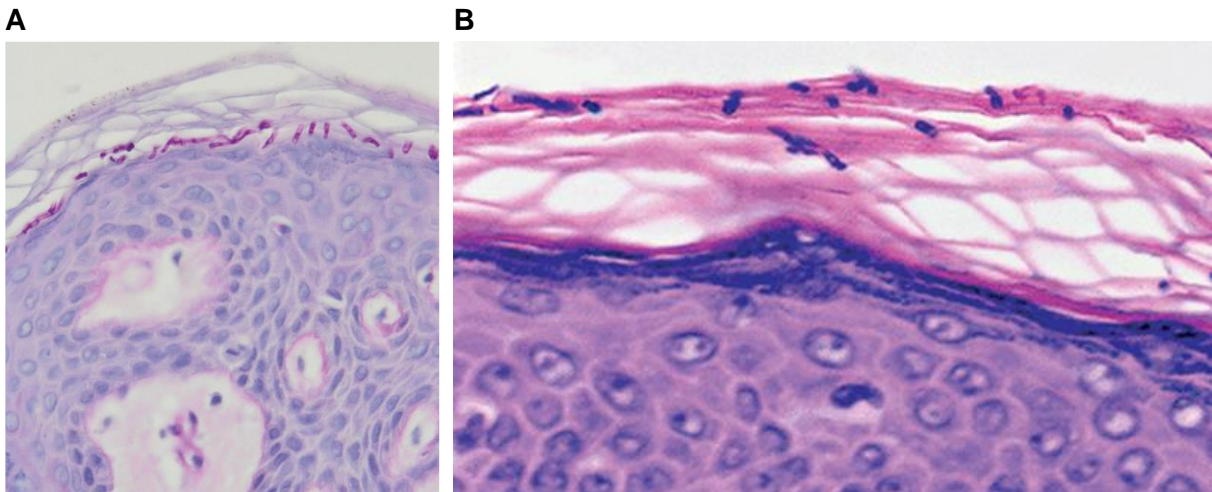


Figure 10 : Coloration par **(A)** l'acide periodique de Schiff (PAS pour *periodic acid Schiff*) ou **(B)** l'HE d'une biopsie réalisée au niveau d'une lésion de dermatophytose cutanée à *T. rubrum* montrant la présence des filaments mycéliens dans la couche cornée (Mills Stacey 2012, Nenoff 2014b).

Etant des infections superficielles, les dermatophytoses n'engagent pas le pronostic vital des patients et ne sont pas des maladies qu'on pourrait qualifier de dangereuses pour la santé. Cependant, les effets sur la qualité de vie des patients sont très importants : outre la douleur et l'inconfort provoqués par les lésions, l'aspect peu esthétique de celles-ci s'accompagne souvent d'un sentiment de honte et d'une diminution de l'estime de soi et des interactions sociales (Drake 1998, Szepietowski 2009).

2.3. Contamination et prédispositions génétiques

La contamination par les dermatophytes peut se faire de manière directe, par contact avec une personne ou un animal infecté, ou de manière indirecte via une surface contaminée. En effet, les arthrospores de dermatophytes sont extrêmement résistantes dans l'environnement et peuvent conserver leur pouvoir infectant pendant plus d'un an (Nenoff 2014a).

Il existe de nombreux facteurs de risque favorisant la contamination par les dermatophytes et le développement de lésions (Garcia-Romero 2015). D'une part, les égratignures, les microtraumatismes de l'ongle, l'absence pré-pubère de sécrétion sébacée ou l'humidité créent une perméabilité locale de l'épiderme qui devient plus sensible aux infections. Les insuffisances circulatoires et l'avancement en âge, qui provoquent une réduction de la circulation sanguine périphérique et un acheminement moins rapide des composants immunitaires sur les sites d'infection, rendent les patients moins aptes à combattre l'infection précocement. D'autre part, un contact fréquent avec des animaux, qu'ils soient domestiques ou d'élevage, de même que la fréquentation des salles de sport ou des piscines, augmentent les risques de transmission.

Le diabète, de par l'atteinte des vaisseaux sanguins périphériques et des terminaisons nerveuses, limitant l'accès des cellules immunitaires et diminuant la sensibilité au niveau des extrémités, est un facteur de risque important de dermatophytoses. En effet, les patients souffrant de diabète présentent un risque 2,77 fois plus élevé que la population générale de développer des dermatophytoses, surtout des teignes du pied ou des ongles (Gupta 1998). La prévalence des onychomycoses chez les patients souffrant de diabète s'étend ainsi de 22% à plus de 50% en fonction des zones géographiques étudiées (Gupta 1998, Saunte 2006, Eckhard 2007, Chang 2008, Takehara 2011).

Le sport, qui prend de plus en plus d'importance dans nos pays industrialisés, est également un facteur de risque important. D'une part, la fréquentation des salles de sport et des piscines renforce les risques de marcher pieds-nus sur des sols potentiellement contaminés (Watanabe 2000). D'autre part, le port de chaussures occlusives et la transpiration excessive sont des conditions idéales pour le développement de mycoses cutanées (Havlickova 2008). De nombreuses études ont ainsi montré des prévalences élevées de dermatophytose, allant de 15% à plus de 70%, chez les sportifs et les nageurs (Gentles 1973, Kamihama 1997, Lacroix 2002).

Dès les années 90, les médecins et chercheurs ont constaté que l'histoire familiale augmentait les risques de développer des dermatophytoses (Zaias 1996, Bonifaz 2004). Depuis, l'existence de prédispositions génétiques a été démontrée (Abdel-Rahman 2017). Ainsi certains haplotypes HLA (*Human leukocytes antigen*) semblent être protecteurs face aux dermatophytoses alors que d'autres augmenteraient les risques d'infection (Zaitz 1996, Asz-Sigall 2010, Garcia-Romero 2012). Des mutations dans le gène encodant la dectine-1, protéine de reconnaissance des β -glucanes fongiques, entraînent également une susceptibilité accrue aux dermatophytoses (Ferwerda 2009), de même que des mutations dans les voies de signalisation impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire antifongique, comme par exemple les gènes encodant les protéines CARD9 (*caspase recruitment domain-containing protein 9*) et STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) (Engelhardt 2012, Lanternier 2013). Un faible nombre de copies du gène DEFB4, encodant le peptide antimicrobien hBD2, est également un élément prédisposant aux dermatophytoses (Jaradat 2015).

2.4. Structure et développement des dermatophytes

2.4.1. Structure des cellules fongiques

Les champignons sont des organismes eucaryotes et les cellules fongiques sont donc caractérisées par un noyau entouré d'une membrane nucléaire et renferment dans leur cytoplasme les organites classiques des cellules eucaryotes, à savoir les mitochondries, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (McGinnis 1996, Mishra 2007). Elles sont également dotées d'un système vacuolaire permettant le recyclage, le stockage et la distribution des métabolites (Deacon 2006). La membrane des cellules fongiques est constituée d'une bicouche phospholipidique et contient de l'ergostérol comme principal stérol. A l'instar du cholestérol présent dans la membrane plasmique des cellules animales, l'ergostérol permet de moduler la fluidité membranaire et sert de précurseur pour d'autres molécules.

Les cellules fongiques sont aussi dotées d'une paroi située à l'extérieur de la membrane plasmique. Cette paroi fongique est une structure rigide responsable de la forme de la cellule et de sa résistance mécanique (Latgé 2007, Pérez 2013). Par sa position, la paroi est également impliquée dans les mécanismes d'adhérence des cellules fongiques entre elles ou avec d'autres organismes. La paroi fongique est composée de polysaccharides, dont les principaux sont les β -glucanes et la chitine, et de glycoprotéines, majoritairement des mannoprotéines (Ross 2001, Bowman 2006, Deacon 2006, Klis 2007). La paroi s'organise en une ou plusieurs couches de microfilaments de chitine agrégés entre eux via l'établissement de ponts hydrogènes, surplombées du côté externe par un enchevêtrement de β -glucanes ramifiés et de glycoprotéines (**Figure 11**). Des liaisons covalentes sont établies entre les β -glucanes et la chitine afin d'assurer la cohésion de l'ensemble.

La composition et l'épaisseur de la paroi fongique varient entre les espèces. La paroi des dermatophytes, qui a été relativement peu étudiée, contient entre autre de la chitine, des β -glucanes, des mannanes et des galactomannanes (Grappel 1969, Ikuta 1997).

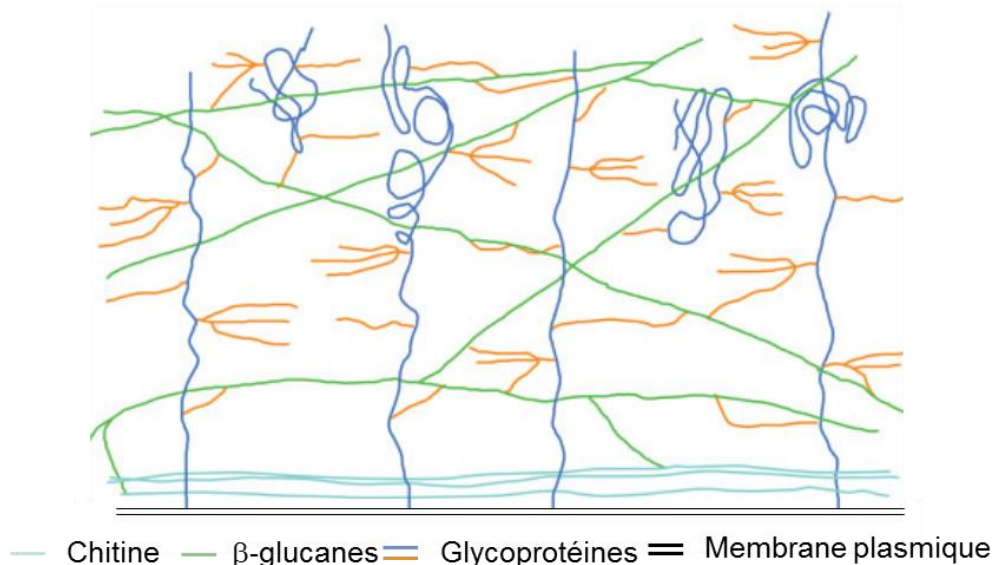


Figure 11 : Structure de la paroi fongique composée d'une ou plusieurs couches de microfilaments de chitine surplombées du côté externe par un enchevêtrement de β -glucanes et de glycoprotéines (Bowman 2006).

2.4.2. Organisation des champignons filamenteux

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux, c'est-à-dire qu'ils se développent en formant des hyphes, aussi appelées filaments mycéliens. Les hyphes sont des structures tubulaires formées par un alignement de cellules fongiques interconnectées et entourées d'une paroi continue (**Figure 12**). Chez les dermatophytes, les hyphes sont divisées à intervalles réguliers en compartiments par des septa qui correspondent à des anneaux de paroi. Des pores sont présents dans les septa et permettent le passage de cytoplasme afin d'assurer une communication tout le long de l'hyphe. Puisque les noyaux peuvent aussi circuler à travers les pores des septa, les compartiments peuvent posséder un nombre variable de noyaux.

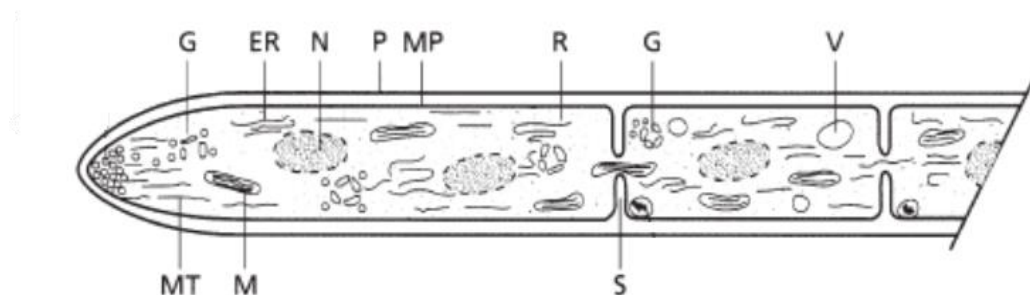


Figure 12 : Structure d'une hyphe formée par l'alignement de cellules fongiques interconnectées et entourées d'une paroi continue. G : appareil de golgi, ER : réticulum endoplasmique, MT : microtubules, M : mitochondrie, N : noyau, P : paroi, MP : membrane plasmique, R : ribosome, S : septum, V : vacuole (Deacon 2006).

2.4.3. Production des spores

Les spores sont des éléments fongiques unicellulaires en état de dormance, ce qui signifie que leur activité métabolique est faible voire inexistante (Deacon 2006d). Elles sont caractérisées par une paroi plus épaisse que celle des hyphes, ce qui leur confère une grande résistance mécanique, et par un contenu important en lipides et glycogène qui fourniront l'énergie nécessaire à leur réactivation. Les spores sont des éléments de résistance et sont produites par les champignons de manière physiologique pour assurer la dispersion de l'espèce, mais aussi lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables afin d'en assurer la survie. Dès que les conditions environnementales redeviennent favorables, les spores se réactivent et forment une nouvelle colonie.

Bien qu'il existe une forme de reproduction sexuée chez les dermatophytes zoophiles et géophiles, les dermatophytes anthropophiles semblent avoir perdu leur capacité à accomplir la reproduction sexuée et utilisent plutôt un mode de reproduction asexué, avec réplication du matériel génétique par mitose (Metin 2017). Deux types de spores peuvent être formés de façon asexuée au départ des hyphes : les conidies et les arthrospores (**Figure 13**) (Deacon 2006b). Les conidies sont formées au départ d'un bourgeonnement se développant à l'extrémité ou sur le côté latéral des hyphes et se détachant de celles-ci. On distingue les microconidies, consistant en un seul bourgeonnement, et les macroconidies formées par des bourgeonnements successifs attachés entre eux. Les arthrospores sont quant à elles produites par fragmentation des hyphes au niveau des septa.

En ce qui concerne les dermatophytes, la production de conidies est observée *in vitro* lorsque le champignon est cultivé sur gélose de Sabouraud. Par contre, en conditions *in vivo*, seule la production d'arthrospores est observée (Rashid 2001).

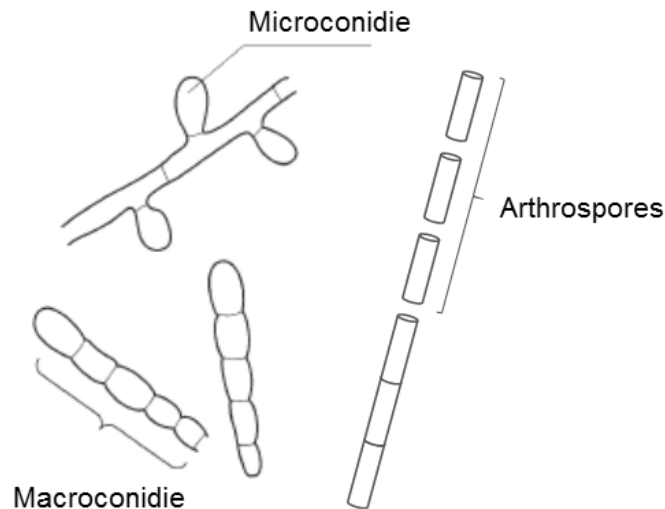


Figure 13 : Deux types de spores sont formés de façon asexuée par les champignons filamenteux : les conidies, par bourgeonnement des hyphes, et les arthrospores par fragmentation des hyphes au niveau des septa. Les microconidies consistent en un bourgeonnement unique alors que les macroconidies sont constituées de bourgeonnements successifs (Image adaptée de Deacon 2006e).

2.4.4. Développement des colonies et croissance

Les colonies fongiques se développent à partir d'une spore qui se réactive lorsque les conditions environnementales sont favorables (Deacon 2006b, Liu 2007). Pour les champignons pathogènes, comme les dermatophytes, ces conditions favorables sont rencontrées lorsqu'une spore a adhéré à la surface du tissu hôte à infecter. Premièrement, la spore entre en croissance non polaire, c'est-à-dire qu'elle gonfle suite à sa réhydratation et au développement de sa paroi. Au même moment les synthèses de protéines et d'acides nucléiques se réactivent afin de permettre l'émergence d'un tube germinatif. Celui-ci synthétise du contenu cellulaire et des composants de paroi tout en s'allongeant et en s'épaississant pour devenir une hyphe. Lorsqu'un volume suffisant est atteint, le noyau se divise et un septum apparaît à l'endroit de la division, créant deux compartiments interconnectés. Le nouveau compartiment recommence alors à synthétiser du contenu pour permettre l'élongation de l'hyphe. Les hyphes ainsi formées continuent de s'allonger par croissance apicale et peuvent également produire des ramifications pour finalement former une colonie. L'ensemble des hyphes interconnectées et formées au départ d'une spore est appelé le « mycélium ».

2.5. Cycle d'infection

Le cycle d'infection des dermatophytes peut se diviser en trois étapes (**Figure 14**). La première étape est l'adhérence, durant laquelle les arthrospores adhèrent à l'épiderme hôte via des interactions entre les molécules de surface fongiques et de l'hôte (Baldo 2007). Une fois bien ancrées, les arthrospores perçoivent qu'elles se trouvent dans un environnement favorable et déclenchent la phase de germination. Les hyphes provenant de la croissance des tubes germinatifs vont alors envahir la couche cornée de l'épiderme tout en digérant la kératine en petits peptides et acides aminés qui seront assimilés par le champignon ; c'est la phase d'invasion. Finalement, les hyphes produiront de nouvelles arthrospores qui seront libérées dans l'environnement, prêtes à infecter un nouvel hôte.

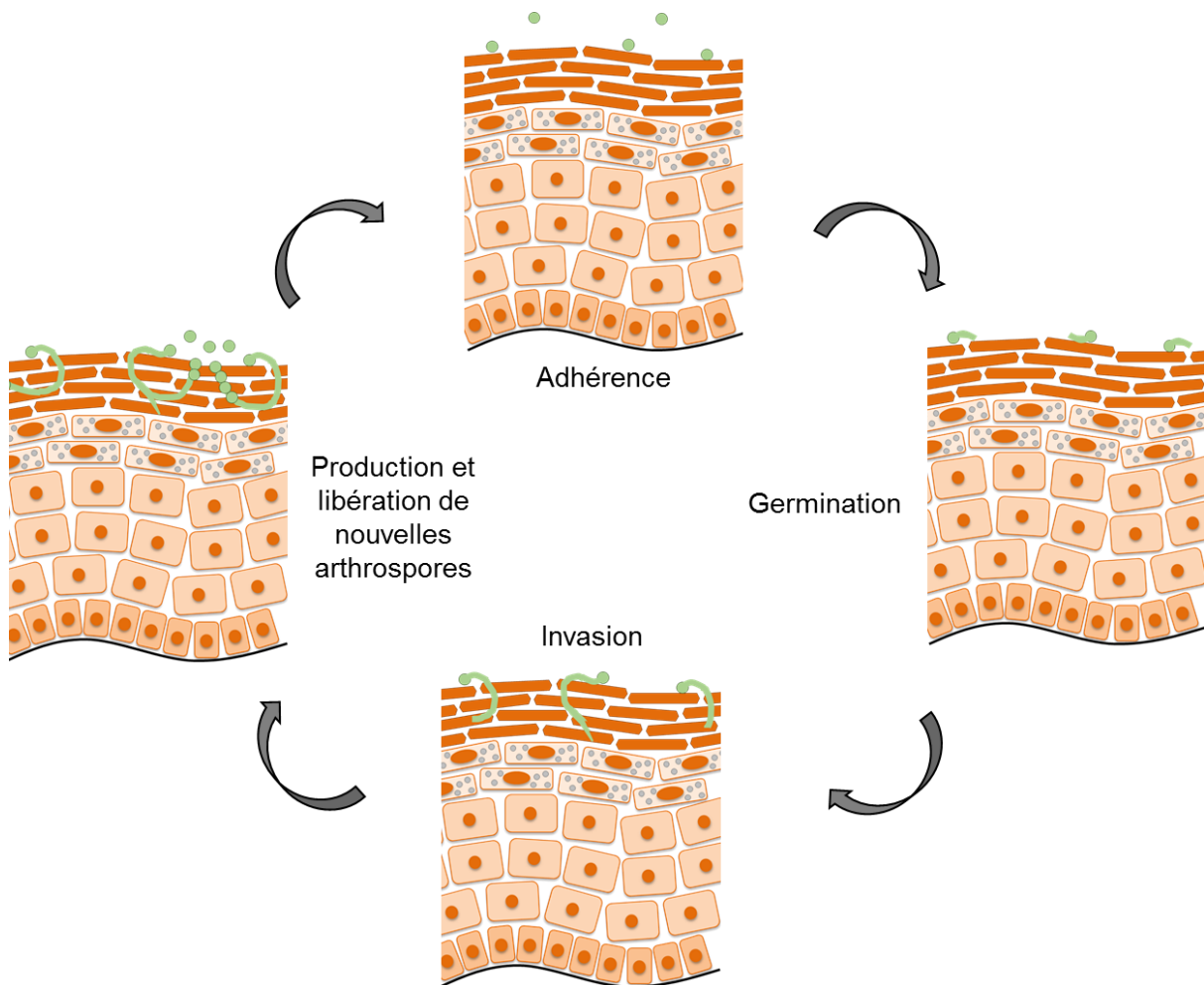


Figure 14 : Cycle d'infection des dermatophytes divisé en trois étapes principales avant la production et la libération de nouvelles arthrospores. Dans la première étape d'adhérence, les arthrospores adhèrent à l'épiderme hôte. Durant l'étape de germination, les arthrospores produisent des tubes germinatifs qui deviendront des hyphes par croissance apicale. Les hyphes seront alors capables de coloniser la couche cornée de l'épiderme hôte lors de la phase d'invasion.

2.5.1. Protéases sécrétées par les dermatophytes

En comparaison à d'autres champignons, les dermatophytes sécrètent un nombre particulièrement élevé de protéases divisées en endoprotéases, qui clivent les liaisons peptidiques internes à la séquence de la protéine, et en exoprotéases clivant les liaisons peptidiques à partir des extrémités de la protéine (Monod 2008). Ces protéases sont impliquées dans la mise en place du cycle d'infection, notamment dans les étapes d'adhérence (Baldo 2008, Baldo 2010, Bagut 2012) et d'invasion (Monod 2008, Baldo 2011), et sont aussi des cibles reconnues par le système immunitaire hôte (Brouta 2003, Descamps 2003). Leur niveau de sécrétion varie fortement d'une espèce à l'autre, expliquant probablement en partie la spécificité d'hôte et la préférence pour certaines régions anatomiques de l'hôte des différentes espèces de dermatophytes (Giddey 2007).

Les endoprotéases sécrétées par les dermatophytes font partie de deux familles, les subtilisines et les fungalysines. Douze subtilisines (Sub), appelées Sub1 à Sub12, ont été identifiées chez les dermatophytes et sont des protéases à sérine ayant la kératine pour substrat naturel (Descamps 2002, Jousson 2004, Lemsaddek 2010). Les fungalysines sont quant à elles des métalloprotéases (MEP) caractérisées par une activité kératinolytique, collagénolytique et élastinolytique (Brouta 2001). Elles sont au nombre de cinq chez les dermatophytes, de MEP1 à MEP5 (Monod 2008). Les dermatophytes sécrètent également des exoprotéases montrant aussi une activité de dégradation envers la kératine. Ces quatre aminopeptidases comportent deux leucine aminopeptidases Lap1 et Lap2, et deux dipeptidyl-peptidases DppIV et DppV (Monod 2005, Vermout 2008).

De manière globale, les protéases Sub3, Sub4 et MEP4 sont les principales à être exprimées par les dermatophytes lorsque ceux-ci sont cultivés *in vitro* sur des milieux protéiques censés mimer les conditions d'infection. Ainsi, Sub3 est la protéase sécrétée de façon majoritaire par *M. canis* lorsque celui-ci est cultivé sur un milieu minimal contenant de la kératine (Mignon 1998). En présence de kératine, de collagène ou d'élastine, les protéases Sub3, Sub4 et MEP4 sont les principales à être exprimées par *T. rubrum* (Leng 2009). Ces mêmes protéases sont également fortement exprimées par *T. benhamiae* durant la croissance de ce dernier sur milieux protéiques (Staib 2010, Tran 2016). Les protéases Sub3, Sub4 et MEP4 ont donc été considérées comme des facteurs de virulence importants pour le développement de l'infection. Cependant, des études récentes ont démontré que les protéases exprimées par les dermatophytes *in vivo* pendant le développement de l'infection diffèrent de celles produites par les mêmes dermatophytes *in vitro* sur milieux protéiques. De ce fait, la protéase Sub6 est la principale à être exprimée *in vivo* par *T. benhamiae* lors de l'infection du cobaye (Staib 2010, Tran 2016) ou par *T. rubrum* dans des lésions d'onychomycoses chez l'homme (Méhul 2016), alors que les protéases Sub3, Sub4 et MEP4 ne sont que peu exprimées *in vivo*. Cette différence dans les profils d'expression des dermatophytes soulève l'importance d'étudier les facteurs de virulence dans des conditions se rapprochant au maximum de celles de l'infection *in vivo* pour analyser correctement la pathogénie de la dermatophytose.

Bien que les protéases citées ci-dessus semblent être celles principalement concernées lors de l'infection, de nombreuses autres protéases sont aussi exprimées et sécrétées par les dermatophytes et leurs rôles restent encore à caractériser (Sriranganadane 2011). Entre outre, les dermatophytes sécrètent également des lipases et des phospholipases (Muhsin 1997, Tran 2016).

2.5.2. Mécanismes d'adhérence

L'adhérence est la première étape du cycle d'infection des dermatophytes durant laquelle les arthrospores s'accrochent à l'épiderme de l'hôte par un mécanisme complexe et peu connu faisant intervenir des molécules de surface et des protéases sécrétées (Martinez-Rossi 2017). De manière générale pour les champignons, les interactions hydrophobes non spécifiques favorisent également l'adhérence, bien que de manière minime (Baldo 2007).

Les arthrospores arborent sur leur surface des protéines de type adhésine capables de lier des hydrates de carbone (adhésines de type lectine) ou des peptides (mannoprotéines) en surface des cellules épidermiques de l'hôte. Il a notamment été montré que des adhésines de type lectine, exprimées en surface des arthrospores de *T. rubrum* et *T. mentagrophytes*, leur permettaient de lier les résidus mannose et galactose en surface des cellules de l'hôte (Esquenazi 2003, Esquenazi 2004, Baldo 2011).

Globalement, toutes les adhésines fongiques partagent une structure en trois domaines : une extrémité C-terminale possédant un site de liaison aux β -glucanes de la paroi fongique, un domaine central en répétitions en tandem, et une extrémité N-terminale porteuse des domaines de liaison aux peptides ou aux hydrates de carbone de l'hôte (Verstrepen 2006). *In vitro*, des adhésines sont exprimées par les dermatophytes dès qu'ils sont mis au contact de kératine ou de kératinocytes (Bitencourt 2016). Le nombre de répétitions et la longueur de l'unité répétée en tandem dans le domaine central de ces adhésines varient fortement entre les espèces de dermatophytes et entre les souches d'une même espèce, expliquant probablement en partie la variabilité des capacités adhésives et d'hôte de ces agents pathogènes (Bitencourt 2016).

Des polysaccharides en surface des arthrospores sont également impliqués dans l'adhérence à l'épiderme hôte. Notamment, les mannanes en surface des arthrospores de *T. rubrum* peuvent se lier au kératinocytes humains via un récepteur non encore identifié (Grando 1992).

Différentes protéases sont exprimées par les dermatophytes dans les étapes précoces de l'adhérence sur des modèles d'explants cutanés *ex vivo* ou sur des modèle animaux *in vivo* : notamment les protéases à sérine de type subtilisine Sub3 et Sub6 (Bagut 2012, Tran 2016) et la dipeptidyl-peptidase DppIV (Mathy 2010, Baldo 2011). Ces protéases seraient donc potentiellement toutes impliquées dans les mécanismes d'adhérence des dermatophytes à l'épiderme hôte et les différences dans leur niveau d'expression entre les espèces influenceraient la spécificité d'hôte.

Jusqu'à présent, seule l'implication de la subtilisine Sub3 dans l'adhérence des arthrospores de *M. canis* à l'épiderme hôte a été démontrée. En effet, sur un modèle d'épiderme félin reconstruit, l'inhibition des protéases à sérine, dont les subtilisines, réduit l'adhérence des arthrospores de *M. canis* de 53% (Baldo 2008). Sur ce même modèle, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre Sub3 diminue l'adhérence de *M. canis* de 23% sans affecter l'activité enzymatique de la protéase. De plus, l'adhérence des arthrospores d'une souche de *M. canis* invalidée pour Sub3 par la méthode d'interférence ARN (Vermout 2007), sur des explants cutanés provenant de différentes espèces animales, y compris l'homme, est diminuée d'environ 90% par rapport à l'adhérence des arthrospores de la souche contrôle de *M. canis* exprimant normalement Sub3 (Baldo 2010, Bagut 2012). Sub3 semble donc impliquée dans les mécanismes d'adhérence des arthrospores à l'épiderme hôte bien que les mécanismes exacts de son implication ne soient pas connus. Par contre, Sub3 n'est

pas nécessaire à l'invasion de l'épiderme hôte par les arthrospores. En effet les arthrospores de la souche de *M. canis* invalidée pour Sub3 sont tout à fait capables d'infecter le cobaye lorsque leur déficit d'adhérence est compensé par l'utilisation de poloxamer 407, augmentant la rémanence des arthrospores sur le site d'infection (Baldo 2010).

2.5.3. Digestion de la kératine et invasion

Les dermatophytes sont capables de dégrader la kératine, ce qui leur permet d'envahir les tissus kératinisés de l'hôte, mais également de l'utiliser comme source de nutriments (Teixera de Aguiar Peres 2010). Cette dégradation se fait en plusieurs étapes et nécessite l'intervention de plusieurs types de protéines (**Figure 15**).

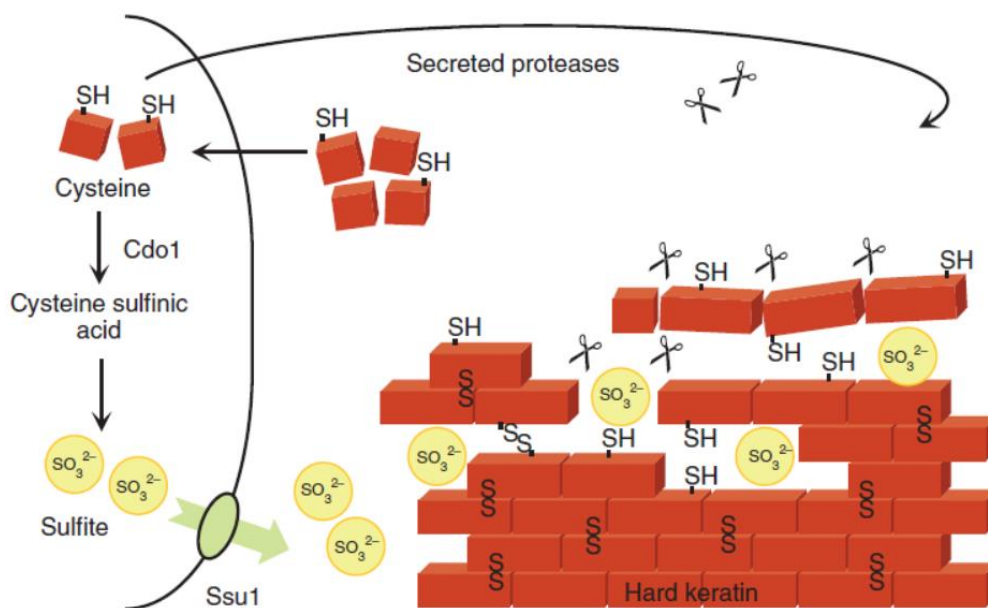


Figure 15 : Mécanisme de dégradation de la kératine par les dermatophytes via la sécrétion de protéases et la réduction des ponts disulfures. Les endoprotéases et exoprotéases fongiques permettent de cliver la kératine respectivement en peptides et acides aminés. Les résidus cystéine produits sont captés par les cellules fongiques et métabolisés par la cystéine dioxygénase Cdo1 en acide cystéine-sulfinique donnant par la suite des sulfites. Ces sulfites sont alors sécrétés par la pompe d'efflux Ssu1 et participent à la dégradation de la kératine via la réduction des ponts disulfures (Grumbt 2013).

Les protéases sécrétées par les dermatophytes permettent la digestion à proprement parler de la kératine puisqu'elles sont capables de rompre les liaisons peptidiques (Monod 2008, Baldo 2011). Les subtilisines et les métalloprotéases sont des endoprotéases qui permettent de cliver la kératine en peptides. Les leucine-aminopeptidases et les dipeptidyl-peptidases, qui sont des exoprotéases, interviennent ensuite pour cliver ces peptides en acides aminés qui sont captés par les cellules fongiques via une diffusion passive au travers de la paroi et via des protéines de transport transmembranaire.

La dégradation de la kératine génère une concentration importante de résidus cystéine toxiques tant pour les cellules humaines que pour les dermatophytes. Ces résidus cystéine sont captés par les cellules fongiques et pris en charge par la cystéine dioxygénase Cdo1. Cette enzyme métabolise la cystéine en acide cystéine-sulfinique, donnant par la suite des sulfites qui sont de puissants agents réducteurs (Grumbt 2013). La pompe d'efflux Ssu1 permet alors la sécrétion des sulfites (Lechenne 2007). Outre l'élimination d'un composé toxique, l'excrétion des sulfites permet de faciliter la dégradation de la kératine par réduction de ponts disulfures, rendant la structure peptidique plus accessible aux protéases fongiques (Kunert 1972).

3. Défenses contre les dermatophytes

3.1. Défenses cutanées non-immunitaires

Différents facteurs naturels permettent de limiter les risques d'infection par les dermatophytes. Le fait de se laver la peau au savon représente le premier moyen d'élimination des arthrospores infectantes avant que celles-ci aient eu le temps d'adhérer et d'envahir le tissu hôte. La peau intacte constitue en elle-même la deuxième et la plus importante barrière contre les dermatophytes. Comme décrit au paragraphe 1.3. **Barrières épidermiques**, l'épiderme, par les barrières physique, chimique et immunitaire qu'il offre, ainsi que le microbiome cutané représentent en effet un obstacle à la colonisation de la peau par des agents pathogènes. La faible humidité de l'épiderme et l'exposition aux UV sont aussi des facteurs allant à l'encontre du développement des dermatophytoses (Wagner 1995), de même que le renouvellement constant de l'épiderme et le phénomène de desquamation qui permettent une élimination mécanique des arthrospores. Enfin, les acides gras saturés présents dans le sébum présentent des propriétés fongistatiques (Rothman 1946, Kligman 1950) dont les mécanismes exacts sont encore peu connus mais sembleraient agir sur la membrane plasmique des champignons (Brogden 2012). Il semble également que la transferrine présente dans le sérum permette de limiter la diffusion des éléments fongiques dans les couches sous-jacentes de l'épiderme (Carlisle 1974, King 1975). La transferrine entrerait en effet en compétition avec les dermatophytes pour la captation du fer qui est un élément essentiel au métabolisme des champignons (Deacon 2006c). Lorsque l'infection s'installe malgré tout, le système immunitaire est recruté pour orchestrer la défense de l'hôte contre ces agents pathogènes.

3.2. Immunité anti-dermatophytes

3.2.1. Immunité innée

L'immunité innée est une réponse rapide et non spécifique qui permet de limiter la dispersion des agents pathogènes et de recruter et d'activer les cellules immunitaires spécifiques qui permettront de les éliminer. La réponse immunitaire innée passe par la reconnaissance des PAMP (*pathogen-associated molecular pattern*) ou des DAMP (*damage-associated molecular pattern*) par les PRR (*pattern recognition receptor*) présents en surface des cellules spécialisées de l'hôte. Différents PAMP ont été identifiés au niveau de la paroi fongique, notamment les β -glucanes et les mannanes (Netea 2008). Des protéases sécrétées par les dermatophytes sont également capables d'induire une réaction immunitaire de la part de l'hôte (Brouta 2003, Descamps 2003). Dans d'autres cas, l'infection induit des dommages tissulaires et c'est la production des DAMP qui sera détectée par les PRR des cellules hôtes (Altmeier 2017). Les PRR activent à leur tour des voies de signalisation qui aboutissent à la mise en place de l'inflammation via la production de cytokines et autres médiateurs inflammatoires. Deux familles de PRR semblent particulièrement impliquées dans la reconnaissance des PAMP fongiques : les TLR et les *C-type lectin receptors* (CLR) (Van de Veerdonk 2008).

Les TLR sont exprimés par les cellules de l'immunité innée, tels les macrophages ou les cellules dendritiques, et par des cellules non-immunitaires, comme les fibroblastes et les cellules épithéliales. Chez l'homme, il existe 10 TLR qui peuvent être membranaires (TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10) ou cytoplasmiques (TLR3, 7, 8 et 9). Lorsqu'ils sont activés par la reconnaissance des PAMP ou des DAMP, les TLR induisent la production de cytokines pro-inflammatoires via des voies de signalisation impliquant le facteur NF κ B (*nuclear factor-kappa B*) et la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Kawasaki 2014). Les TLR2, 4, 6 et 9 semblent être les principaux impliqués dans la reconnaissance des composants fongiques tels les mannanes ou l'ADN (Van de Veerdonk 2008). Une augmentation de l'expression des TLR2 et 4 par les PMN félins en réponse à l'infection par les arthrospores de *M. canis* a en effet pu être observée *in vitro* (Cambier 2016). Les TLR2, 4 et 6 voient également leur niveau d'expression modifié dans des kératinocytes humains *in vitro* en présence des conidies de *T. rubrum* (Garcia-Madrid 2011). L'augmentation de l'expression des TLR2 et 4 par les kératinocytes en présence de dermatophytes a été confirmée *in vivo* par immunomarquage sur des biopsies prélevées au niveau des lésions cutanées chez des patients atteints de dermatophytoses (Brasch 2014).

Les CLR sont des récepteurs spécialisés dans la reconnaissance des hydrates de carbone présents en surface des agents pathogènes. Parmi les CLR, la dectine-1 et la dectine-2, présentes en surface des cellules dendritiques, des PMN et des macrophages, sont capables de reconnaître respectivement les β -glucanes et les α -mannanes fongiques et d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires (Taylor 2007, Saijo 2011). Notamment, il a été montré que la dectine-2 pouvait se lier aux hyphes des dermatophytes *T. rubrum* et *M. audouinii* (Sato 2006).

La production et la libération de PAMP par l'organisme hôte est un moyen rapide de défense contre les agents infectieux. Les PAMP appartiennent à l'immunité innée et font partie intégrante de la barrière chimique de l'épiderme (voir paragraphe **1.3.1. Peptides antimicrobiens**). A l'heure actuelle, aucune étude n'a permis de confirmer le rôle des PAMP dans l'immunité antifongique. Toutefois, un faible nombre de copies du gène DEFB4, encodant la hBD2, est associé à un niveau basal d'expression faible de ce PAMP et à une susceptibilité accrue des patients à développer des dermatophytoses (Jaradat 2015). De plus, il a été montré *in vitro* que les peptides hBD2, hBD3, RNase 7, S100A7 ainsi que la cathélicidine LL-37 étaient capables d'inhiber la croissance de différentes espèces de dermatophytes, dont *T. rubrum*, *T. interdigitale* et *M. canis* (Lopez-Garcia 2006, Fritz 2012, Firat 2014). De même, une action fongicide a été démontrée pour la β -défensine-3 murine, homologue de la β -défensine-2 humaine (Jiang 2010). Une surexpression de ces différents peptides, hBD2, hBD3, RNase 7, S100A7 et cathélicidine LL-37, par les kératinocytes humains en réponse à la présence de dermatophytes a également été observée *in vitro* (Firat 2014) et *in vivo* (Lopez-Garcia 2006, Jensen 2007, Brasch 2014), suggérant un potentiel rôle de ceux-ci dans la défense de l'organisme contre les dermatophytoses. En outre, les β -défensines hBD2 et hBD3 induisent la prolifération des kératinocytes et accélèrent le renouvellement de l'épiderme (Niyonsaba 2007), favorisant l'élimination des éléments fongiques par desquamation.

3.2.2. Immunité adaptative

L'immunité adaptative fait intervenir les lymphocytes T et les lymphocytes B et permet une réponse spécifique et ciblée afin d'éliminer les agents infectieux. La réponse immunitaire adaptative est initiée par la reconnaissance par les lymphocytes T d'un antigène spécifique présenté en surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Joffre 2009). Lorsque l'antigène est présenté aux lymphocytes T via le CMH de type I, ceux-ci vont se différencier en lymphocytes T cytotoxiques CD8+, capables de provoquer la lyse des cellules infectées. Lorsque c'est le CMH de type II qui présente l'antigène, les lymphocytes T se différencient en lymphocytes T helper CD4+ qui pourront à leur tour emprunter quatre voies de différenciation principales ; il s'agit des voies Th1, Th2, Th17 ou Treg (**Figure 16**) (Altmeier 2017). La voie empruntée par les lymphocytes T helper dépend des cytokines « initiatrices » présentes dans l'environnement et produites principalement par les CPA, et passe par l'activation d'un facteur de transcription propre à chaque voie (Chakir 2003, Zhou 2008, Korn 2009). Les lymphocytes T différenciés produiront à leur tour différentes cytokines « effectrices » et induiront des réponses spécifiques en fonction de la voie dans laquelle ils se sont engagés. Il faut noter que l'engagement des lymphocytes T dans une voie mène à l'inhibition de la différenciation dans les autres voies.

La voie Th1 est dite « immunité cellulaire » et passe par l'activation via l'IFN γ des macrophages qui vont détruire les cellules infectées et résorber l'infection. La voie Th2 est quant à elle appelée « immunité humorale » et fait intervenir les lymphocytes B et la production d'anticorps qui participeront à l'élimination des antigènes circulants par opsonisation et activation du système du complément. Lorsque les lymphocytes T se différencient vers la voie Th17, ils produisent les cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22 qui permettent le recrutement des PMN et la production de PAM et de cytokines pro-inflammatoires (Cambier 2010). Finalement, les lymphocytes Treg ont la propriété d'inhiber la prolifération des autres lymphocytes T effecteurs via la production de cytokines anti-inflammatoires. Ils sont nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire et à l'arrêt de la réponse immune déclenchée en réponse aux agressions une fois que l'agent agresseur a été éliminé.

Le rôle indispensable des lymphocytes T dans la résolution des dermatophytoses a été établi depuis longtemps. En effet, déjà en 1982 Green et collaborateurs démontraient l'incapacité des souris *nude* à guérir d'une infection par *T. mentagrophytes* (Green 1982). Par ailleurs, le transfert de lymphocytes T d'une souris infectée par *Trichophyton quinckeanum* à une souris naïve protège cette dernière contre l'infection par ce dermatophyte (Calderon 1984). Jusqu'il y a peu, il était donc communément admis que la réponse immune efficace et protectrice contre la plupart des infections fongiques était une réponse cellulaire faisant intervenir les lymphocytes Th1 (Blanco 2008). Les dermatophytoses ne faisaient pas exception et l'activation de la voie Th1 et la production d'IFN γ étaient considérés comme seuls responsables de la résolution de l'infection (Almeida 2008, Mignon 2008). En effet, de l'IFN γ est produit par les macrophages, les PMN et les lymphocytes T après stimulation par des antigènes de dermatophytes (Koga 1993, Koga 2001) et son expression est également détectée dans des biopsies réalisées au niveau de lésions cutanées de dermatophytoses (Miyata 1996).

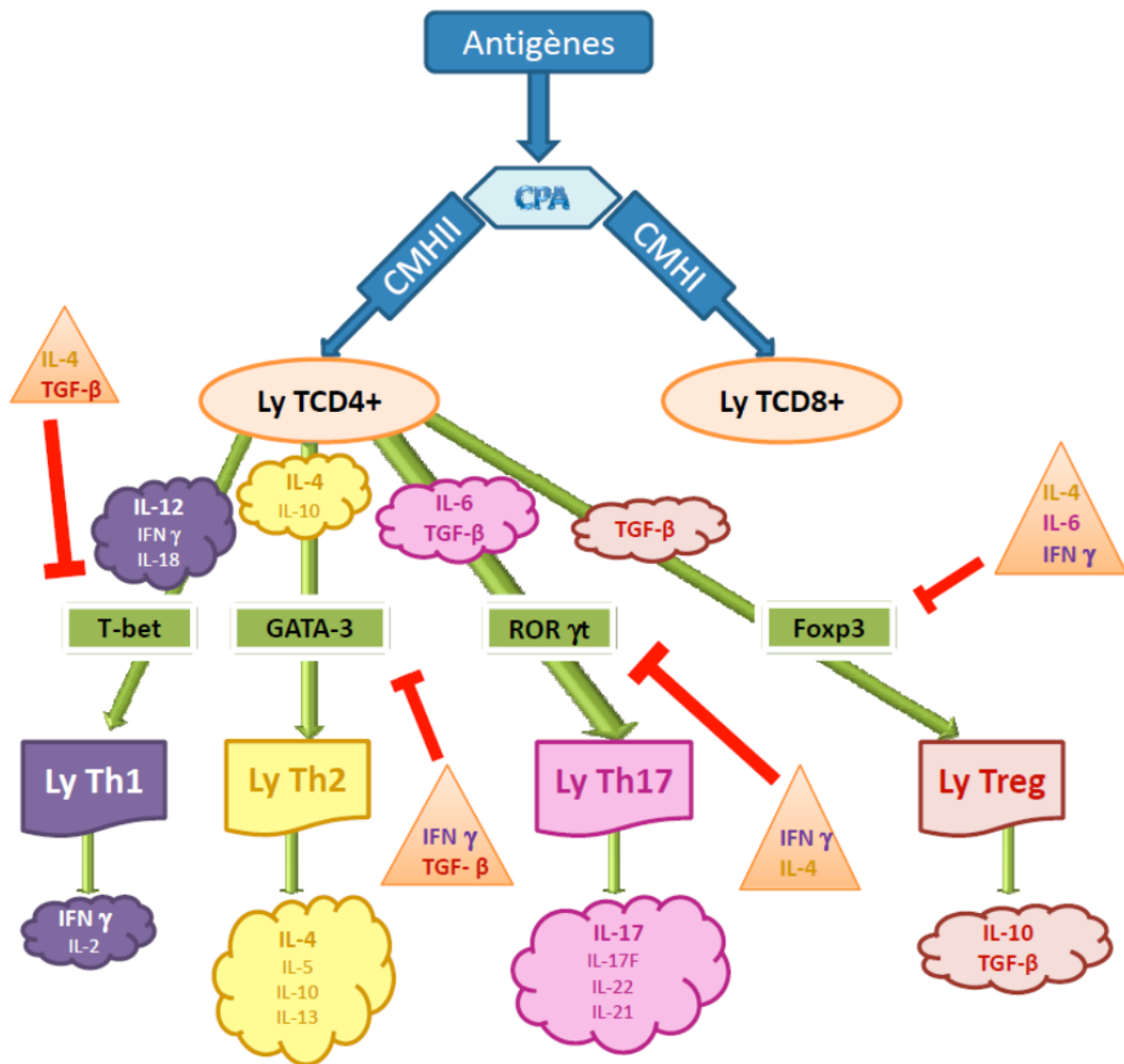


Figure 16 : Voies de différenciation des lymphocytes T helper CD4+ après présentation de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigène via le CMH de type II. La voie de différenciation empruntée par les lymphocytes T CD4+ dépend de l'environnement cytokinique : l'IL-12 est la principale cytokine associée à la voie Th1 tandis que l'IL-4 correspond à la voie Th2. Le TGF- β en association avec l'IL-6 permet l'induction de la voie Th17, alors que le TGF- β seul induit plutôt la voie Treg. L'activation de ces différentes voies est permise par l'activation d'un facteur de transcription propre à chaque voie : T-bet (*T-box expressed in T cells*) pour la voie Th1, GATA-3 (*GATA binding protein 3*) pour la voie Th2, ROR γ t (*retinoid-related orphan receptor gamma t*) pour la voie Th17 et finalement Foxp3 (*forkhead box protein 3*) pour les cellules Treg. Les lymphocytes T différenciés en Th1, Th2 ou Th17 produisent des cytokines effectrices qui sont respectivement l'IFN γ , l'IL-4 et l'IL-17. Les cytokines effectrices des lymphocytes Treg sont les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- β (Cambier 2010).

Cependant, des études plus récentes démontrent que les lymphocytes Th17 interviendraient dans la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice contre les infections fongiques (Cambier 2010, Altmeier 2017), notamment contre la candidose et l'aspergillose (Romani 2011). La voie Th17 pourrait également être impliquée dans la réponse immunitaire contre les dermatophytes. De fait, la production d'IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-17, IFN γ et IL-12 par des kératinocytes humains stimulés *in vitro* par *T. benhamiae* suggère une activation des voies Th1 et Th17 et une coopération entre ces deux voies (Shiraki 2006). L'activation simultanée des voies Th1 et Th17 a également été envisagée suite à une étude *in vivo* ayant montré une augmentation de l'expression d'IFN γ et d'IL-17A dans les ganglions lymphatiques et une production d'IL-1 β , IFN γ , IL-6 et IL-23 dans la peau de souris inoculées par *T. mentagrophytes* (Nakamura 2012). Plus récemment, une production accrue d'IL-1 β , TGF- β (*transforming growth factor beta*) et IL-6 a été démontrée dans un modèle murin d'infection cutanée par les arthrospores de *T. benhamiae* ou *T. mentagrophytes*, confirmant l'activation de la voie Th17 en réponse à l'infection par les dermatophytes (Cambier 2014).

Une production d'anticorps spécifiques peut être observée au cours des dermatophytoses (Blanco 2008, Romani 2011). Par exemple, la présence d'anticorps IgE et IgG spécifiquement dirigés contre les protéases DpplV et Sub6 de *T. rubrum* a été détectée dans le sérum de patients préalablement immunisés contre ce dermatophyte (Woodfolk 1998). De même, des IgG spécifiques de la protéase MEP3 sont produits chez le cobaye après infection de celui-ci par les conidies de *M. canis* (Brouta 2003). Toutefois, les anticorps ne joueraient pas un rôle protecteur contre les dermatophytoses (Brouta 2003, Blanco 2008, Romani 2011). Le transfert de sérum d'une souris infectée par *T. quinckeanum* à une souris naïve ne protège en effet pas cette dernière contre l'infection (Calderon 1984). Néanmoins, il a été montré que la production d'anticorps particuliers en quantité suffisante pouvait protéger contre certaines infections fongiques. Des anticorps protecteurs et non-protecteurs ont par exemple été identifiés dans des cas d'infection par *C. albicans* (Casadevall 1995). Les principales fonctions reconnues des anticorps dans les infections fongiques incluent la prévention de l'adhérence, la neutralisation de toxines, l'opsonisation et la cytotoxicité cellulaire (Polonelli 2000). Les champignons peuvent donc induire la production d'anticorps protecteurs et non-protecteurs, cependant les mécanismes par lesquels ces anticorps sont produits et sélectionnés ne sont pas encore connus à l'heure actuelle.

3.2.3. Mise en place de l'immunité cellulaire Th17

La différenciation des lymphocytes T helper CD4+ naïfs en lymphocytes Th17 est un processus complexe faisant intervenir différentes cytokines et l'activation du facteur de transcription ROR γ t.

Premièrement, les cellules de l'immunité innée (macrophages, PMN, cellules dendritiques et cellules épithéliales) détectent la présence de l'agent pathogène via leurs PRR. Dans le cas de l'infection par *C. albicans*, la dectine-1, la dectine-2 et le TLR2 semblent être les PRR impliqués dans le déclenchement d'une réponse Th17 efficace et protectrice (Van de Veerdonk 2009, Saijo 2010). La reconnaissance des PAMP fongiques par ces PRR induit la mise en place de l'inflammasome et l'activation du facteur NF κ B via une voie de signalisation impliquant CARD9 (Engelhardt 2012). Les cellules de l'immunité innée produisent et libèrent alors les cytokines TGF- β , IL-6, IL-1 β , IL-21 et IL-23, créant le profil cytokinique adéquat à la

mise en place de l'immunité Th17 (Wilson 2007, Volpe 2008). En effet, la reconnaissance de l'IL-6 et de l'IL-21 par leur récepteur en surface des lymphocytes T naïfs induit l'augmentation de l'expression du facteur de transcription ROR γ t via une voie de signalisation passant par STAT3. Le TGF- β , à basse concentration et en association avec l'IL-6, induit quant à lui l'expression du récepteur à l'IL-23 dont l'activation par l'IL-23 est nécessaire à la stabilisation de la voie Th17 (Zhou 2008). Simultanément, les CPA présentent les antigènes fongiques via le CMH de type II aux lymphocytes T naïfs qui se différencieront finalement en lymphocytes Th17.

Le fait que des mutations pertes de fonction dans les gènes encodant la dectine-1, CARD9 ou STAT3 augmentent la susceptibilité des patients à développer des dermatophytoses, suggère que la mise en place d'une réponse immune protectrice contre les dermatophytes implique effectivement la voie Th17 (Ferwerda 2009, Engelhardt 2012, Lanternier 2013).

Une fois activés, les lymphocytes Th17 produisent à leur tour diverses cytokines, dont les principales sont IL-17A (plus connue sous le nom IL-17), IL-17F, IL-21 et IL-22. Ces cytokines entraînent la libération d'autres cytokines pro-inflammatoires et de PAM ainsi que l'activation des PMN et leur recrutement sur le site d'infection (Heinen 2017). Les cellules épithéliales, dont les kératinocytes, et les fibroblastes expriment les récepteurs à l'IL-17 et à l'IL-22 et sont responsables de la production des cytokines pro-inflammatoires et des PAM. Le recrutement et l'activation des PMN passent quant à eux par la production d'IL-8 et de GM-CSF par les cellules épithéliales en réponse à l'IL-17.

3.2.4. Rôle des cellules immunitaires

Les premières cellules rencontrées par les dermatophytes lors de l'infection sont les kératinocytes qui sont capables de détecter la présence des éléments fongiques dans l'environnement via leur reconnaissance par les PRR. Les kératinocytes activés peuvent alors produire diverses cytokines favorisant la mise en place de l'inflammation et l'activation subséquente de la réponse immunitaire adaptative. Différentes études réalisées sur des kératinocytes humains en monocouche ont en effet révélé une expression et une libération accrues de différentes cytokines, TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, G-CSF et GM-CSF, en présence de dermatophytes (Nakamura 2002, Achterman 2015). Cependant, cette réponse cytokinique varie fortement en fonction de l'espèce de dermatophyte infectante, les libérations de cytokines étant généralement plus importantes en présence de dermatophytes zoophiles, tels *T. benhamiae* et *T. mentagrophytes*, qu'en présence de dermatophytes anthropophiles comme *T. rubrum* et *T. tonsurans* (Shiraki 2006, Tani 2007). En outre, les kératinocytes de la couche épineuse possèdent des capacités de phagocytose (Wolff 1971) ; les corps étrangers se retrouvent alors enfermés dans les phagosomes où, soit, ils sont détruits suite à la fusion du phagosome avec un lysosome, soit ils y restent jusqu'à être éliminés par la desquamation.

Les PMN sont recrutés au site d'infection par les chémokines libérées par les kératinocytes (Nakamura 2002). Une fois sur le site d'infection, les PMN sont capables de reconnaître les PAMP fongiques via les PRR exprimés en leur surface, notamment les TLR2 et 4 (Cambier 2016), et de phagocyter les éléments de petite taille, c'est-à-dire les arthrospores (Brakhage 2010). L'élimination des éléments phagocytés se fait alors par expression au sein des phagosomes de l'iNOS (*inducible nitric oxide synthetase*) qui produit des radicaux libres

capables d'oxyder les composants fongiques. La phagocytose d'éléments fongiques de plus grande taille, à savoir les hyphes produites suite à la germination des arthrospores, n'est pas possible. Toutefois, les PMN disposent d'une autre stratégie afin de se débarrasser des agents infectieux extracellulaires : la formation du NET (*neutrophil extracellular trap*) (Yoshikawa 2017a). La mise en place du NET résulte d'une forme de mort cellulaire particulière durant laquelle les PMN libèrent leur contenu pour former un filet, composé de fibres d'ADN recouvertes de granules, contenant protéases et PAM. Ce filet emprisonne les grands éléments fongiques, empêche leur dissémination et favorise le recrutement des PMN et autres cellules immunitaires sur le site d'infection (Urban 2009, Brakhage 2010). La formation du NET par les PMN en réponse au dermatophyte *T. benhamiae* a pu être démontrée (Heddergott 2012).

Indépendamment de leur action directe sur les agents pathogènes, les PMN sont aussi responsables de la production de cytokines et interviennent donc dans la mise en place de l'inflammation. Les PMN humains libèrent de l'IL-8 en réponse au dermatophyte *T. benhamiae* (Heddergott 2012) et une libération d'IL-1 β , d'IL-8 et de TNF α par les PMN félines en réponse au dermatophyte *M. canis* a également été observée (Cambier 2013).

Les macrophages sont recrutés au site d'infection par les chémokines libérées par les kératinocytes. Tout comme les PMN, ils sont capables d'éliminer les agents pathogènes par phagocytose et de libérer des cytokines permettant le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires. Ainsi une libération de TNF α et d'IL-1 β , via l'activation de l'inflammasome, par les macrophages a été observée suite à la stimulation par les conidies de *T. rubrum* (Campos 2006, Yoshikawa 2015, Yoshikawa 2017b).

Les cellules dendritiques sont des CPA professionnelles, capables d'orienter la différenciation des lymphocytes T par production de cytokines et présentation de l'antigène via le CMH. Dans la peau, deux types de cellules dendritiques sont présents : les cellules de Langerhans dans l'épiderme (Streilein 1984) et les cellules dendritiques interstitielles dans le derme. En pratique, les cellules dendritiques vont reconnaître les antigènes étrangers via les PRR, les internaliser et les transformer en peptides antigéniques afin de les présenter en leur surface via le CMH. Les cellules dendritiques vont alors migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles activent les lymphocytes T. Durant leur migration, les cellules dendritiques subissent une maturation au cours de laquelle elles vont perdre leur capacité de phagocytose, augmenter leur expression du CMH et de co-stimulateurs et réguler leur production de cytokines en fonction de la voie immunitaire qui sera déclenchée. Plus précisément dans le cas des dermatophytoses, il a été montré que les cellules dendritiques produisent du TNF α , IL-6, IL-8 et IL-10 lorsqu'elles sont mises au contact du dermatophyte *T. benhamiae* (Heddergott 2012). Une production d'IL-12 par des cellules dendritiques félines a également été observée en présence des arthrospores de *M. canis* (Tabart 2008a).

3.2.5. En résumé

Au vue de toutes ces informations, il apparaît probable qu'une coopération entre les voies cellulaires Th1 et Th17 représente la réponse immunitaire protectrice contre les infections par les dermatophytes. Le schéma hypothétique suivant peut dès lors être proposé pour expliquer la mise en place de cette réponse immunitaire (**Figure 17**).

Premièrement, les kératinocytes détectent la présence des dermatophytes via la reconnaissance des PAMP fongiques par les TLR, principalement les TLR2, 4 et 6, et produisent différentes cytokines pro-inflammatoires, telles IL-1 α , IL-1 β , TNF α et IL-8, responsables du recrutement des PMN et macrophages sur le site d'infection. En même temps, les cellules dendritiques détectent l'infection via les TLR et les dectines-1 et 2. Ces cellules vont alors produire de l'IL-8 et du TNF α qui participent au recrutement des PMN et macrophages. A ce stade, la barrière épidermique intervient également dans le contrôle de l'infection, notamment grâce aux PAM.

La maturation des cellules dendritiques en CPA et leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires permet la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes spécialisés Th1 et Th17, via les productions d'IL-12 et d'IL-6 respectivement. Les lymphocytes T activés migrent alors vers le site d'infection et produisent des cytokines spécialisées : IFN γ pour les lymphocytes Th1 et IL-17 et IL-22 pour les lymphocytes Th17.

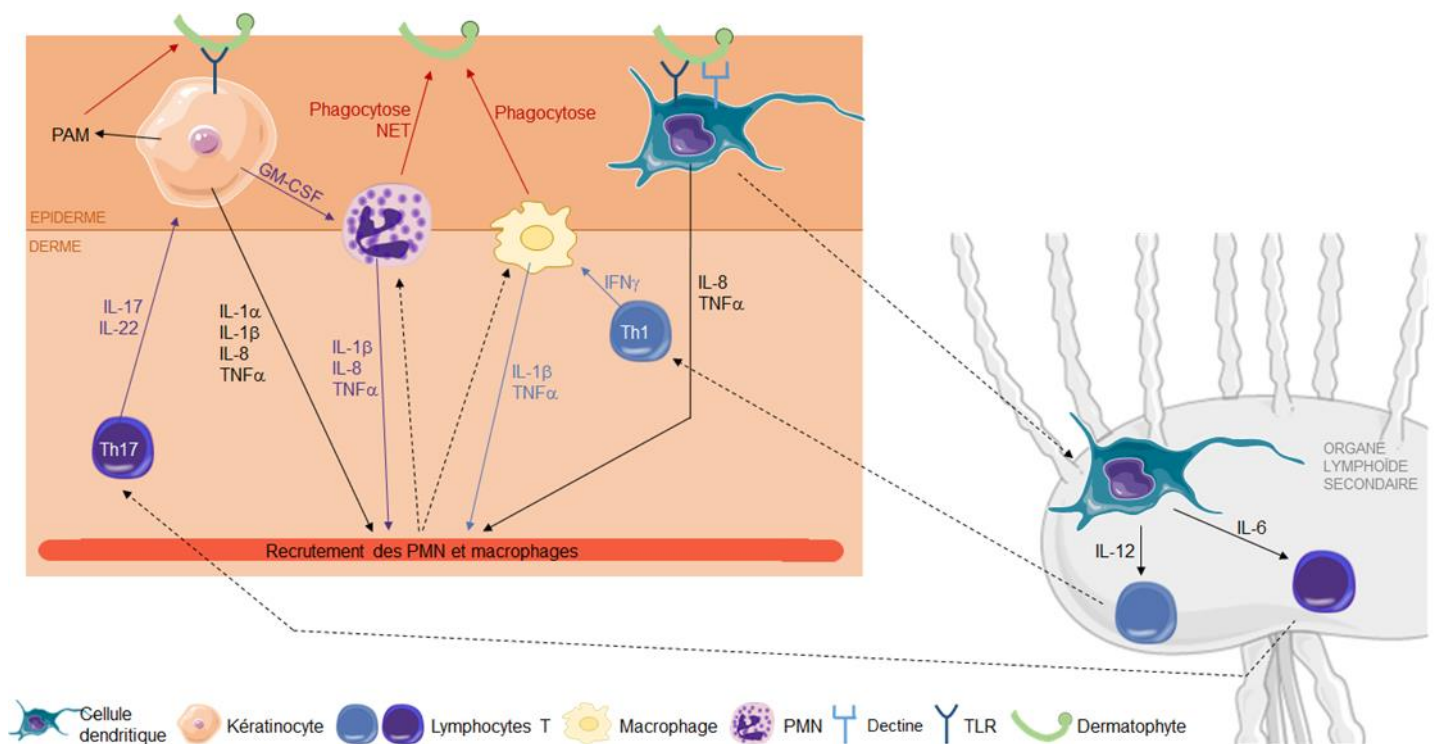


Figure 17 : Mise en place de la réponse immunitaire efficace contre les dermatophytes. Les éléments fongiques présents dans l'épiderme sont détectés par les récepteurs de type TLR et dectine exprimés en surface des kératinocytes et des cellules dendritiques. Les kératinocytes réagissent à l'infection par production de cytokines pro-inflammatoires et de peptides antimicrobiens (PAM) tandis que les cellules dendritiques migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles activent et dirigent la différenciation des lymphocytes T par présentation des antigènes étrangers et production de cytokines spécifiques. Les lymphocytes T différenciés en lymphocytes Th1 et Th17 migrent alors vers le site d'infection où ils induisent respectivement l'activation des macrophages et polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) qui sont finalement responsable de l'élimination des agents pathogènes.

L'IFN γ stimule les macrophages, capables de phagocytose et de production de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α . L'IL-17 et l'IL-22 renforcent quant à elles la production de cytokines pro-inflammatoires et de PAM par les kératinocytes. Sous la stimulation de l'IL-17 les kératinocytes libéreront également du GM-CSF, responsables de la migration des PMN sur le site d'infection et de leur activation. Les PMN participeront alors à l'élimination des agents pathogènes via la phagocytose et la formation du NET, et produiront également des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-8 et TNF α .

Cependant, ce schéma hypothétique nécessite d'être complété et vérifié pour chaque type d'infection. En effet, les profils cytokiniques mesurés varient fortement en fonction de l'espèce de dermatophyte impliquée et du modèle d'étude utilisé. Il est donc important de clarifier ce modèle dans le cas précis de la dermatophytose humaine cutanée aiguë provoquée par *T. rubrum*, qui est la forme de dermatophytose la plus répandue à l'heure actuelle.

3.2.6. Immuno-modulation par *T. rubrum*

De manière générale, une relation inverse existe entre le degré d'inflammation produit par un dermatophyte particulier et la chronicité de l'infection (Wagner 1995). Dans ce sens, l'espèce anthropophile *T. rubrum* provoque le plus souvent des infections chroniques et peu inflammatoires chez l'homme. En effet, ce dermatophyte est extrêmement bien adapté à son hôte et a acquis des capacités d'immuno-modulation. Notamment, il exprime en sa surface des mannanes particuliers capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes (Blake 1991, McGregor 1992). *T. rubrum* est également capable d'induire la libération d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, par les macrophages (Campos 2006). De plus, les conidies de *T. rubrum* peuvent se développer et former des hyphes à l'intérieur même des macrophages, après phagocytose, conduisant à la mort de ceux-ci (Yoshikawa 2017b). Finalement, nous avons récemment observé dans notre laboratoire une augmentation de l'expression de TSG-6 (*TNF α -stimulated gene 6*), protéine anti-inflammatoire, par les kératinocytes après infection par les arthrospores de *T. rubrum* sur un modèle d'épiderme humain reconstruit (Evrard C, Faway E, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. 2017, données non publiées).

La localisation superficielle des dermatophytes dans la couche cornée pourrait également être vue comme un moyen d'immuno-évasion, empêchant un contact éventuel avec des cellules immunitaires (Wagner 1995).

4. Traitement des dermatophytoses

Bien que certaines dermatophytoses puissent guérir spontanément en quelques mois, la prise d'un traitement s'avère nécessaire dans la majorité des cas. Une grande variété d'agents antifongiques sont actuellement disponibles et les plus fréquemment utilisés sont les dérivés azolés (itraconazole, fluconazole, efinaconazole, miconazole, etc.) ou la terbinafine qui agissent par inhibition de la synthèse de l'ergostérol, composant essentiel de la membrane cellulaire des champignons (Ghannoum 1999, Barasch 2008, Tatsumi 2013). De manière générale chez les dermatophytes, les cas de résistance aux traitements antifongiques sont très rares et seul un cas occasionnel de résistance à la terbinafine a pu être observé (Mukherjee 2003, Osborne 2005).

Ces agents antifongiques peuvent être utilisés en application topique ou en prise systémique en fonction de l'étendue, de la sévérité et de l'accessibilité des lésions (Gupta 2008, Gupta 2017). Ainsi les teignes corporelles et du pied sont généralement traitées localement alors que la prise systémique d'un traitement est recommandée pour les teignes du cuir chevelu et des ongles, et pour les cas sévères ou récalcitrants des autres formes de dermatophytose. Par exemple, le traitement recommandé pour les teignes du pied est l'application topique de terbinafine ou d'un dérivé azolé (généralement sertaconazole ou luliconazole) sous forme de crème une à deux fois par jour pendant une à quatre semaines. Dans le cas des onychomycoses, la prise orale d'un agent antifongique (généralement la terbinafine ou l'itraconazole) pendant six à douze semaines est requise (Asz-Sigall 2017).

Toutefois, malgré l'existence de molécules antifongiques efficaces, la prise en charge des dermatophytoses est confrontée à plusieurs difficultés (Gupta 2017). Premièrement, le traitement est long, ce qui induit des problèmes de compliance de la part des patients qui arrêtent généralement la prise du traitement dès l'amélioration des signes cliniques. Cet arrêt prématuré du traitement contribue à la survenue de nombreux cas de rechutes ou de réinfections. Deuxièmement, l'administration systémique des molécules antifongiques peut s'accompagner d'effets secondaires sur le système nerveux central (migraines, étourdissements, difficultés de concentration), sur le système gastro-intestinal (nausées, diarrhées, douleurs abdominales) et sur le système cutané (érythème, éruptions, prurit) ainsi que d'une certaine toxicité hépatique (Raschi 2014). De plus, bien que des vaccins existent en milieu vétérinaire, leur efficacité n'est pas toujours prouvée (Lund 2008). Aucun vaccin n'existe par contre chez l'homme.

Au vu de ces problèmes liés aux traitements existants, ainsi qu'à une incidence en augmentation, la mise au point d'un traitement préventif constituerait l'un des meilleurs moyens pour lutter contre les dermatophytoses. L'existence de porteurs asymptomatiques est également un élément en faveur du développement d'un traitement prophylactique (Kamihama 1997, Lacroix 2002).

5. Modèle expérimentaux de dermatophytose

De nombreux modèles expérimentaux ont été mis au point pour étudier les mécanismes d'infection mis en place par les dermatophytes pour envahir le tissu hôte, mais aussi pour évaluer la réponse immunitaire de l'hôte, ou pour tester l'efficacité de molécules antifongiques.

Des modèles *ex vivo* sur cornéocytes en suspension (Zurita 1987), fragments de couche cornée, obtenu par « *tape stripping* » (Aljabre 1992), fragments d'ongles ou de cheveux (Grumbt 2013) ont été utilisés. Toutefois, ces modèles ne contiennent pas de kératinocytes vivants et ne permettent donc pas d'évaluer la réponse de l'hôte face à l'infection.

Des cultures en monocouche de kératinocytes (Nakamura 2002, Shiraki 2006, Firat 2014, Achterman 2015) ou de PMN (Cambier 2013) permettent d'appréhender la manière dont ces cellules réagissent à la présence des dermatophytes, notamment via la mesure de la libération de cytokines ou de PAM. Cependant, les kératinocytes en culture monocouche ne subissent pas le processus de kératinisation qui est pourtant indispensable à l'étude des mécanismes d'adhérence et d'invasion mis en place par les dermatophytes.

L'utilisation d'explants cutanés de différentes espèces animales (Duek 2004, Kaufman 2007, Baldo 2010, Bagut 2012, Baldo 2012, Teixeira de Aguiar Peres 2016), de même que les modèles *in vivo* sur cobaye (Baldo 2010), souris (Cambier 2014) ou sur d'autres espèces animales (Cambier 2017) permettent d'étudier à la fois la pathogénie des dermatophytoses et la réponse de l'hôte. Malgré tout, les mécanismes peuvent être différents entre l'homme et l'animal, d'où la nécessité d'un modèle d'étude humain. Les explants cutanés humains représenteraient dès lors une bonne alternative mais leur utilisation est limitée par une faible disponibilité et une grande variabilité entre les échantillons. Récemment, la mise au point de modèles de dermatophytose sur épiderme humain reconstruit a permis de palier à de nombreuses limitations.

Les épidermes reconstruits sont actuellement les modèles *in vitro* les plus complets et les plus proches de l'épiderme *in vivo* et permettent d'étudier les interactions entre kératinocytes et agents pathogènes, ainsi que les dégâts occasionnés par ces derniers sur la barrière épidermique. Notamment des études menées sur *C. albicans* (Green 2004) ou sur des invasions percutanées par helminthes (Jannasch 2015) ont déjà démontré le potentiel de ces tissus reconstruits dans l'étude de la biologie de ces infections.

Différents modèles de dermatophytose sur épiderme humain reconstruit ont été mis au point. En 1995, Rashid et collaborateurs ont développé le premier modèle de dermatophytose sur peau humaine reconstruite qui a permis de confirmer l'efficacité antifongique de la terbinafine (Rashid 1995). Plus récemment, deux modèles de dermatophytose sur des tissus épidermiques commerciaux EpiDerm (MatTek) (Achterman 2015) ou EpiSkin® (Liang 2016) ont été développés. Le premier a été utilisé pour évaluer la libération des cytokines par les kératinocytes en réponse à l'infection et les voies de signalisation impliquées. Une analyse morphologique des étapes de l'infection a été réalisée sur le second modèle. Toutefois ces modèles utilisent les conidies, produites par bourgeonnement des hyphes (voir paragraphe **2.4.3. Production des spores**), comme éléments infectants. Bien que produites par les dermatophytes cultivés *in vitro* sur gélose de Sabouraud, les conidies n'ont jamais été identifiées au sein de lésions *in vivo* chez des patients où l'on retrouve uniquement les arthrospores, issues de la fragmentation des hyphes (Rashid 2001). L'utilisation

d'arthrospores dans les modèles expérimentaux de dermatophytose serait donc plus proche des conditions *in vivo* que l'utilisation de conidies.

Sous des conditions de culture particulières alliant un milieu pauvre en nutriments et une forte concentration en CO₂, il est possible de produire des arthrospores *in vitro* (Tabart 2007). Ainsi un modèle de dermatophytose utilisant les arthrospores comme éléments infectants a déjà été mis au point sur épiderme félin reconstruit et a permis de démontrer l'implication de la protéase fongique Sub3 dans l'adhérence des arthrospores de *M. canis*. Ce modèle s'est également révélé être un outil valide pour tester l'efficacité de molécules antifongiques (Tabart 2008b).

OBJECTIFS

Objectifs

Ce travail s'inscrit dans le contexte d'un projet intitulé MycAvert, financé par la Région Wallonne dans le cadre du programme WB Health, faisant intervenir cinq équipes, dont quatre de l'université de Liège, et ayant pour finalité le développement d'un « délivrable » utile à la prévention des dermatophytoses chez l'homme. En effet, aucun vaccin ni traitement préventif n'existe à l'heure actuelle. Les molécules antifongiques classiques, tels les dérivés azolés ou la terbinafine, se montrent généralement efficaces contre les dermatophytoses. Cependant, ces traitements sont longs et coûteux, présentent certains problèmes de toxicité hépatique et surtout, ne préviennent pas des récurrences, pourtant fréquentes chez les personnes à risque comme les patients diabétiques et les sportifs. L'existence de porteurs asymptomatiques souligne également l'intérêt de développer un produit préventif contre les dermatophytoses. Or, la mise au point d'un tel produit nécessite une connaissance approfondie de la pathogénie de l'infection.

Bien que les dermatophytoses soient les mycoses les plus communes chez l'homme avec une incidence en augmentation, ces infections restent relativement peu étudiées. Notamment les mécanismes utilisés par les dermatophytes pour adhérer et envahir le tissu hôte, de même que les mécanismes moléculaires déployés par les cellules hôtes, en vue de la mise en place d'une réponse immunitaire efficace, sont encore insuffisamment connus.

L'objectif de cette recherche, dans le contexte de la dermatophytose humaine, a donc été d'identifier et de mieux comprendre les interactions qui existent au niveau épidermique entre les dermatophytes et l'homme et qui conduisent au développement de l'infection et, plus tard, à la mise en place d'une réponse immunitaire.

Le manque de connaissances sur la pathogénie des dermatophytoses résulte notamment de la difficulté à obtenir un modèle humain adéquat pour l'étude de ces infections. En effet, les modèles de cultures de kératinocytes en monocouche sont dépourvus du processus de kératinisation pourtant indispensable à l'étude des mécanismes d'adhérence et d'invasion mis en place par les dermatophytes. L'utilisation d'explants cutanés humains est quant à elle freinée par une disponibilité limitée et une variabilité souvent trop grande entre les prélèvements. La première partie de ce travail a dès lors consisté en la mise au point et en la caractérisation d'un modèle *in vitro* de dermatophytose sur épiderme humain reconstruit (RHE) en culture. Puisqu'il s'agit de l'espèce responsable de la majorité des infections chez l'homme, le dermatophyte anthropophile *Trichophyton rubrum* a été utilisé.

Dans la seconde partie de ce travail, le modèle de dermatophytose développé sur RHE a été exploité pour étudier l'impact de l'infection sur la structure et la fonction de barrière du tissu épidermique humain, notamment pour mieux comprendre les mécanismes d'invasion utilisés par les dermatophytes. Simultanément, l'expression et la libération de cytokines et de peptides antimicrobiens par les kératinocytes au cours de l'infection ont également été évaluées afin de préciser les réponses fournies par les kératinocytes en vue d'alerter le système immunitaire et de combattre l'infection.

Enfin, le modèle de dermatophytose sur RHE s'est révélé être un outil valide pour effectuer des tests d'efficacité de molécules antifongiques. Il a dès lors été utilisé pour évaluer l'efficacité éventuelle des peptides préventifs développés à l'université de Liège dans le cadre du projet MycAvert (pour plus de détails, voir en annexe notre contribution au rapport de ce projet).

RESULTATS

PARTIE 1 : Mise au point et caractérisation d'un modèle d'infection par le dermatophyte anthropophile *Trichophyton rubrum* sur épiderme humain reconstruit

La dermatophytose est une infection fongique superficielle des structures kératinisées et touche actuellement entre 20 et 25% de la population humaine. Cette prévalence déjà élevée est en augmentation, surtout au sein de populations à risque comme les patients diabétiques et les sportifs, ce qui soulève une réelle nécessité de développement de nouvelles stratégies prophylactiques. Cependant le manque de connaissances à propos des mécanismes d'infection mis en place par les dermatophytes et des réponses précoces de l'hôte visant au déclenchement d'une réponse immunitaire protectrice, freine le développement de telles stratégies. Dans le but d'améliorer les connaissances actuelles en ce qui concerne l'infection par les dermatophytes, la première partie de ce travail a consisté en la mise au point d'un modèle de dermatophytose sur épiderme humain reconstruit (RHE).

Les RHE ont été infectés par application topique des arthrospores du dermatophyte anthropophile *Trichophyton rubrum*. Le niveau d'invasion des RHE par les éléments fongiques a été observé après coloration à l'acide periodique de Schiff et le taux d'infection a été mesuré par quantification du nombre de copies de l'ADN ribosomique 18S de *T. rubrum* par PCR quantitative. Une méthode basée sur le dénombrement des arthrospores non-adhérentes, récupérées par rinçages des RHE, a permis de calculer le pourcentage d'arthrospores adhérentes après différents durées de contact entre arthrospores et RHE. Enfin, l'observation en microscopie électronique à balayage de la surface des RHE infectés a permis d'évaluer la germination des arthrospores de *T. rubrum* après leur adhérence sur l'épiderme hôte.

Les arthrospores de *T. rubrum* prolifèrent et envahissent progressivement la couche cornée des RHE durant les quatre jours suivant l'infection sans envahir les couches de kératinocytes vivants. L'adhérence est une étape précoce puisque 20% des arthrospores adhèrent déjà aux RHE après seulement une heure de contact et ferait intervenir l'activité d'au moins une protéase à sérine fongique, dont fait probablement partie la protéase de type subtilisine Sub3 comme cela a préalablement été démontré pour l'espèce zoophile *Microsporum canis* (Baldo 2008, Baldo 2010, Bagut 2012). La germination des arthrospores en surface des RHE se produit quant à elle dès la quatrième heure de contact. Par ailleurs, le modèle de dermatophytose sur RHE s'est révélé être un outil valide pour tester l'efficacité de composés antifongiques. Enfin, ce modèle a pu être adapté pour les espèces zoophiles *M. canis* et *Trichophyton benhamiae* (anciennement appelé *Arthroderma benhamiae*) par modulation de la densité d'arthrospores appliquées sur les RHE.

En conclusion, l'infection des RHE est représentative des lésions cutanées de dermatophytose *in vivo* et a permis d'évaluer les étapes précoces du cycle d'infection des dermatophytes. Dans la deuxième partie de ce travail, le modèle de dermatophytose et les outils développés permettront d'étudier l'impact de l'infection sur la structure et la fonction du tissu épidermique ainsi que la réponse des kératinocytes (voir **PARTIE 2 : Etude de l'impact de l'infection sur la barrière épidermique et réponse des kératinocytes**).

Full title:

Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: a new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents

Short title:

***In vitro* model of human dermatophytosis**

Émilie Faway¹, Ludivine Cambier², Bernard Mignon², Yves Poumay¹ and Catherine Lambert de Rouvroit¹

¹ URPHYM-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium

² FARAH, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

Correspondence: Professor Yves Poumay, Cell and Tissue Laboratory, URPHYM-NARILIS, University of Namur, 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium.

E-mail: yves.poumay@unamur.be

Phone: +32 81 72 42 57

Keywords

- Dermatophytosis
- Reconstructed Human Epidermis
- Model of infection
- *Trichophyton rubrum*
- Miconazole

Abstract

Dermatophytosis is a superficial fungal infection of keratinized structures that exhibits an increasing prevalence in humans and is thus requesting novel prophylactic strategies and therapies. However, precise mechanisms used by dermatophytes to adhere at the surface of the human epidermis and invade its *stratum corneum* are still incompletely identified, as well as the responses provided by the underlying living keratinocytes during the infection. We hereby report development of an *in vitro* model of human dermatophytosis through infection of reconstructed human epidermis (RHE) by arthroconidia of the anthropophilic *Trichophyton rubrum* species or of the zoophilic *Microsporum canis* and *Arthroderma benhamiae* species. By modulating density of conidia in the inoculum and duration of exposure to such pathogens, fungal infection limited to the *stratum corneum* was obtained, mimicking severe but typical *in vivo* situation. Fungal elements in infected RHE were monitored over time by histochemical analysis using Periodic-Acid Schiff-staining or quantified by qPCR-detection of fungal genes inside RHE lysates. This model brings improvements to available ones, dedicated to better understand how dermatophytes and epidermis interact, as well as to evaluate preventive and therapeutic agents. Indeed, miconazole topically added to RHE was demonstrated to suppress fungal infection in this model.

Introduction

Dermatophytosis is a superficial infection of keratinized structures of the host due to several species of keratinolytic fungi named dermatophytes. *In vivo*, infection of human glabrous skin by dermatophytes is limited to the *stratum corneum*¹, except in immunosuppressed patients where fungal elements can be observed in deeper tissues²⁻⁴. Absence of immune cells and serum inside the *stratum corneum*, as well as the presence of tight junctions between keratinocytes of the *stratum granulosum*, might explain why dermatophytes remain localized in the superficial epidermal layer⁵. Prevalence of dermatophytosis is estimated around 20% in the global human population but is increasing for the last decade in industrialized countries, principally due to immigration and travel, as well as to more frequent sport activities, marked aging of the population and rising incidence of both diabetes and vascular diseases⁶. Among the numerous species of dermatophytes referred as being able to infect humans, the anthropophilic *Trichophyton rubrum* species is responsible for more than 90% of human lesions^{7,8}.

Despite their threatening prevalence, information is still lacking about mechanisms used by dermatophytes to adhere^{9,10} and invade^{11,12} host tissues, as well as about specific responses adopted by keratinocytes present in the underlying living layers in order to alert the immune system and fight against these pathogens. In addition, the current availability of effective drugs for the treatment of human dermatophytosis is rather limited. Although most human lesions can be treated locally, other require

systemic treatment, due to their extent or poor accessibility for a topical treatment of the lesion. Furthermore, treatment with systemic drugs remains expensive and often associated with potential toxicity, and must cope with the emergence of drug-resistance^{13,14}. Finally, patients who suffer from epidermal lesions caused by dermatophytes are often subject to recurrence after primary infection. Taken together, the problems associated with currently available treatments raise the need for developing novel preventive and curative strategies and compounds against dermatophytes.

In order to gain knowledge about the pathogenesis of dermatophytosis, as well as to perform safe and relevant *in vitro* efficacy testing for innovative preventive strategies or new fungicidal compounds, modeling dermatophytosis in a model based on *in vitro* reconstructed human epidermis (RHE) appears as a valuable tool for basic and preclinical studies.

Several models of dermatophytosis have been previously proposed such as stripped sheet of *stratum corneum*¹⁵, nails or hairs samples¹⁶, or epidermal cell cultures prepared as monolayers^{17,18}. *Ex vivo* infection models of human skin explants by dermatophytes have also been developed to evaluate fungal growth^{19,20}, mechanisms of adherence⁹ and modulation of gene expression²¹ during infection. However, all those models present serious limitations. On one hand, stripped sheets of *stratum corneum*, like nails and hairs, do not contain any living keratinocytes and therefore impede evaluation of eventual responses of host to infection. On the other hand, monolayers of cultured keratinocytes cannot proceed to keratinization although the process is required to analyze dermatophytosis and mechanisms involved in its pathogenesis. Finally, the use of human skin explants is limited due to restricted availability and variability between samples (thickness, hairiness). Recently, cultured skin equivalents were used to overcome such limitations and appeared relevant to mimic lesions caused by the disease²²⁻²⁴ and to test the efficacy of antifungal molecules^{25,26}.

RHE can be produced from cultured normal human keratinocytes, seeded at high density onto a polycarbonate filter, fed from the lower compartment, and exposed to air-liquid interface in order to induce keratinization and formation of the cornified barrier. RHE have been characterized to be morphologically and functionally similar enough to the human epidermis in order to become relevant tools for studies of physiological and pathological features of this tissue²⁷⁻²⁹. In addition, RHE were demonstrated suitable for the characterization of keratinocyte responses to chemical compounds, either irritant or sensitizer, layered onto the *stratum corneum*³⁰.

In this study, this RHE model was evaluated to study *in vitro* infection by anthropophilic dermatophyte *T. rubrum* as well as by zoophilic *Microsporum canis* or *Arthroderma benhamiae* species. Mechanisms involved in fungal infection, such as adhesion of conidia, invasion and proliferation of dermatophytes, were investigated, as well as responses induced in the hosting epidermis. Finally, proving efficacy of miconazole in such a model has started paving a way for testing newly developed antifungal agents.

Materials and Methods

Dermatophyte strains and production of arthroconidia

Three different strains of *T. rubrum* were used in this study, namely IHEM 13894, IHEM 13809 and IHEM 13886 as well as strain IHEM21239 of *M. canis* and strain IHEM20163 of *A. benhamiae*. Strains of *T. rubrum* and *A. benhamiae* were isolated from naturally infected human skin, while *M. canis* strain was isolated from naturally infected cat hair. All these strains were obtained from the Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM/IHEM collection of biomedical fungi and yeasts, Brussels).

Arthroconidia were produced as previously described ²². Briefly, fungi were grown on Sabouraud dextrose agar at 27°C for three weeks to reach confluency of the cultures. Fungal material was then scraped, cut into small pieces and seeded over 2% yeast extract/1% peptone (YEN) agar. After approximately two weeks of culture on YEN agar at 30°C in an atmosphere containing 12% CO₂, surface mycelium was scraped, cut into small pieces again and added to sterile Phosphate-Buffered Saline (PBS). This solution was stirred for two hours at 4°C and then filtered through three Miracloth layers (22-25 µm pore size; Millipore cat. no. 475855) in order to recover unicellular fungal elements corresponding to arthroconidia. The culture plates were observed under the microscope during the production process for the obtention of arthroconidia and microconidia were never observed. The concentration of arthroconidia was determined by seeding the prepared solution onto Sabouraud dextrose agar and counting colony-forming units (CFU) after seven days of growth at 27°C. Arthroconidia were stored at 4°C and used within one month.

Reconstructed human epidermis and culture media

RHE were prepared as previously described ²⁷. In brief, normal human keratinocytes were isolated from adult skin samples obtained at plastic surgery (Dr. Bienfait, Clinique St. Luc, Namur-Bouge, Belgium). Third passage keratinocytes were seeded onto polycarbonate culture inserts (0.4 µm pore size; Millipore cat. no. PIHP01250) at a density of 250,000 cells/cm² in EpiLife medium (Invitrogen-Cascade Biologics™ cat. no. M-EPI-500-CA) supplemented with Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS; Invitrogen-Cascade Biologics™ cat. no. S-001-5) and containing 1.5 mM Ca²⁺ concentration. After 24 h, keratinocytes were exposed to the air-liquid interface by carefully removing culture medium above the filter, while the medium under the filter was replaced by EpiLife medium supplemented with HKGS, 1.5 mM Ca²⁺, 10 ng/ml keratinocyte growth factor (KGF; R&D systems cat. no. 251-KG) and 50 µg/ml vitamin C. The medium was then changed every two days. Fully differentiated RHE were obtained eleven days after seeding. Infected RHE were also cultured in EpiLife medium supplemented with HKGS, 1.5 mM Ca²⁺, 10 ng/ml KGF and 50 µg/ml vitamin C.

Histological processing and staining

For histology, RHE were fixed by incubation for 24 hours in 4% formaldehyde solution, dehydrated in methanol, and then incubated in toluene before embedding in paraffin. Tissue sections (6 μ m thickness) were prepared perpendicular to the polycarbonate filter. Then sections were deparaffinized, rehydrated, rinsed with water and finally stained. Periodic-Acid Schiff (PAS) staining was then performed, using hemalun for counterstaining as in standard protocols.

In order to degrade intracellular glycogen, tissue sections were deparaffinized, rehydrated, rinsed with water and incubated for one hour in 0.1% α -amylase from porcine pancreas (Sigma cat. no. A3176) dissolved in PBS solution, prior to PAS-staining and hemalun counterstaining as usual.

DNA extraction

For total DNA extraction, infected RHE previously frozen at -80°C were homogenized using Tissue Grinder (NIPPON Genetics EUROPE cat. no. NG010). DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen cat. no. 69504) was used for isolation and purification of total DNA from tissue, according to the manufacturer's instructions.

Primer specificity and standard curve for quantitative PCR (qPCR)

For amplification of the gene sequence corresponding to *T. rubrum* 18S rDNA gene (*Tr* 18S), primers 18SrDNA-F (5'-TAACGAACGAGACCTTAACC-3') and 18SrDNA-R (5'-TTATTGCCTCAAACCTTCAT-3'), previously described by Paugam *et al.* ³¹, were used. Amplification mixture was composed of 30 ng total DNA extracted from infected or control RHE, 0.3 mM dNTP, 50 mM MgSO₄, 1X *Pfx* amplification buffer, one unit Platinum *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen cat. no. 11708-013) and 300 nM of each primer in a total volume of 50 μ l. Amplification program was 5 min denaturation at 94°C, 40 cycles of denaturation for 30 sec at 94°C, annealing for 30 sec at 60°C and elongation for 45 sec at 68°C with a final elongation step of 10 min at 68°C. Amplification products were electrophoresed on agarose gels, stained with ethidium bromide, and observed under ultraviolet illumination. Primers specificity was confirmed by obtaining a unique PCR product of expected molecular size after DNA analysis from pure *T. rubrum* mycelium, after analysis from infected RHE, but not after analysis of DNA extracted from non-infected RHE.

A standard curve of known *Tr* 18S rDNA copy number was required for absolute quantification of infection using quantitative PCR. *Tr* 18S rDNA was amplified from DNA extracted from infected RHE as described above and purified using MinElute® PCR Purification Kit (Qiagen cat. no. 28004), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the concentration of purified product was measured using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) and *Tr* 18S rDNA copy

number was calculated using Avogadro's number. Concentration was adjusted to 10^{10} *Tr* 18S rDNA copies/ μ l and standard curve was obtained by serial dilution from 10^8 down to 10^1 *Tr* 18S rDNA copies/ μ l.

Absolute quantification by qPCR

PCR mixture was composed of Takyon™ ROX SYBR® Master Mix (Eurogentec cat. no. UF-RSMT-B0701), 300 nM of 18SrDNA-F primer, 300 nM of 18SrDNA-R primer and 20 ng of DNA in a total volume of 15 μ l. The amplification protocol involved 10 min of denaturation at 95°C followed by 45 cycles of denaturation for 10 sec at 95°C, annealing for 10 sec at 60°C and elongation for 10 sec at 72°C. Absolute quantification was performed according to standard curve of serial dilution from 10^8 down to 10^1 *Tr* 18S rDNA copies/ μ l.

Measurement of RHE viability using MTT assay

In this study, MTT assay was performed in order to assess the effect of miconazole or dimethyl-sulfoxide (DMSO), which is the solvent of miconazole, on cellular viability in the RHE. In practice, RHE were incubated for four hours in presence of miconazole or its solvent, then incubated for one hour with 0.5 mg/ml of tetrazolium dye MTT (Sigma cat. no. M5655). RHE were then transferred for 30 min in isopropanol to solubilize and homogenize formazan produced inside living keratinocytes, and the optical density of the solution was determined at 540 nm using a VersaMax Microplate Reader spectrophotometer (Molecular Devices).

Statistical Analyses

All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5 software. One-way analysis of variance (ANOVA1) were performed to analyze our data. A *P* value of 0.05 or less was taken as being significant.

Results

Infection of RHE using *T. rubrum* arthroconidia

RHE were infected on the 11th day of reconstruction, when their morphological and functional features were becoming similar to those of the human epidermis *in vivo* ²⁹. For infection, *T. rubrum* IHEM 13894 arthroconidia, in suspension in PBS, were topically applied on the top of RHE. Several inoculum sizes were tested in order to determine the amount of arthroconidia required to initiate an infection limited to the cornified layer, as observed *in vivo*. The density chosen to inoculate RHE was 1,700 arthroconidia per cm². Four hours after inoculation, fungal suspension was eliminated and three washes with PBS were performed in order to remove non-adherent arthroconidia and to expose keratinocytes to the air-liquid interface again. Then, infected RHE were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for four additional days with culture medium changed every day. Samples were then collected and processed for histological analysis.

PAS staining was used to detect dermatophytes in sections of infected RHE. Indeed, this histochemical procedure highlights polysaccharides, such as chitin, which is the main component of fungal cell wall. However supra-basal keratinocytes inside RHE were surprisingly stained after the PAS staining. Pretreatment of RHE sections with α -amylase, an enzyme which digests glycogen, proved that this staining in keratinocytes actually corresponds to glycogen accumulation (**Figure 1A**). Thus, α -amylase pretreatment has been systematically performed before PAS staining in all subsequent experiments in order to improve specificity of fungal detection using this technique.

During the four days following inoculation, morphological analysis of infected RHE revealed that arthroconidia proliferated over time and progressively invaded the *stratum corneum* of the RHE without reaching layers containing living keratinocytes, as it usually happens during *in vivo* infection. From the fifth day after inoculation, fungal elements started to invade layers composed of living keratinocytes, leading to severe tissue damage (**Figure 1B**).

To validate our model, we infected RHE with arthroconidia from two other strains of *T. rubrum*, namely IHEM 13809 and IHEM 13886 strains, using the same procedure. Staining of infected RHE four days after inoculation, showed that arthroconidia from the different *T. rubrum* strains invade RHE in a similar manner (**Figure 1C**).

In addition, we adapted this infection model to other dermatophyte species. RHE were infected with arthroconidia from *M. canis* IHEM 21239 or from *A. benhamiae* IHEM 20163 using the procedure described above. Different sizes of inoculum were tested in order to determine the number of arthroconidia requested to develop infection similar to that obtained with *T. rubrum*. Inoculation by arthroconidia of *M. canis* or of *A. benhamiae*, at a density of respectively 17,000 and 53 per cm², induced infection which remained limited to the cornified layer at the fourth day following the inoculation (**Figure**

1C). Those results suggest that this model could be adapted to study epidermal infection by other species.

All subsequent experiments were performed using arthroconidia from *T. rubrum* IHEM 13894 strain.

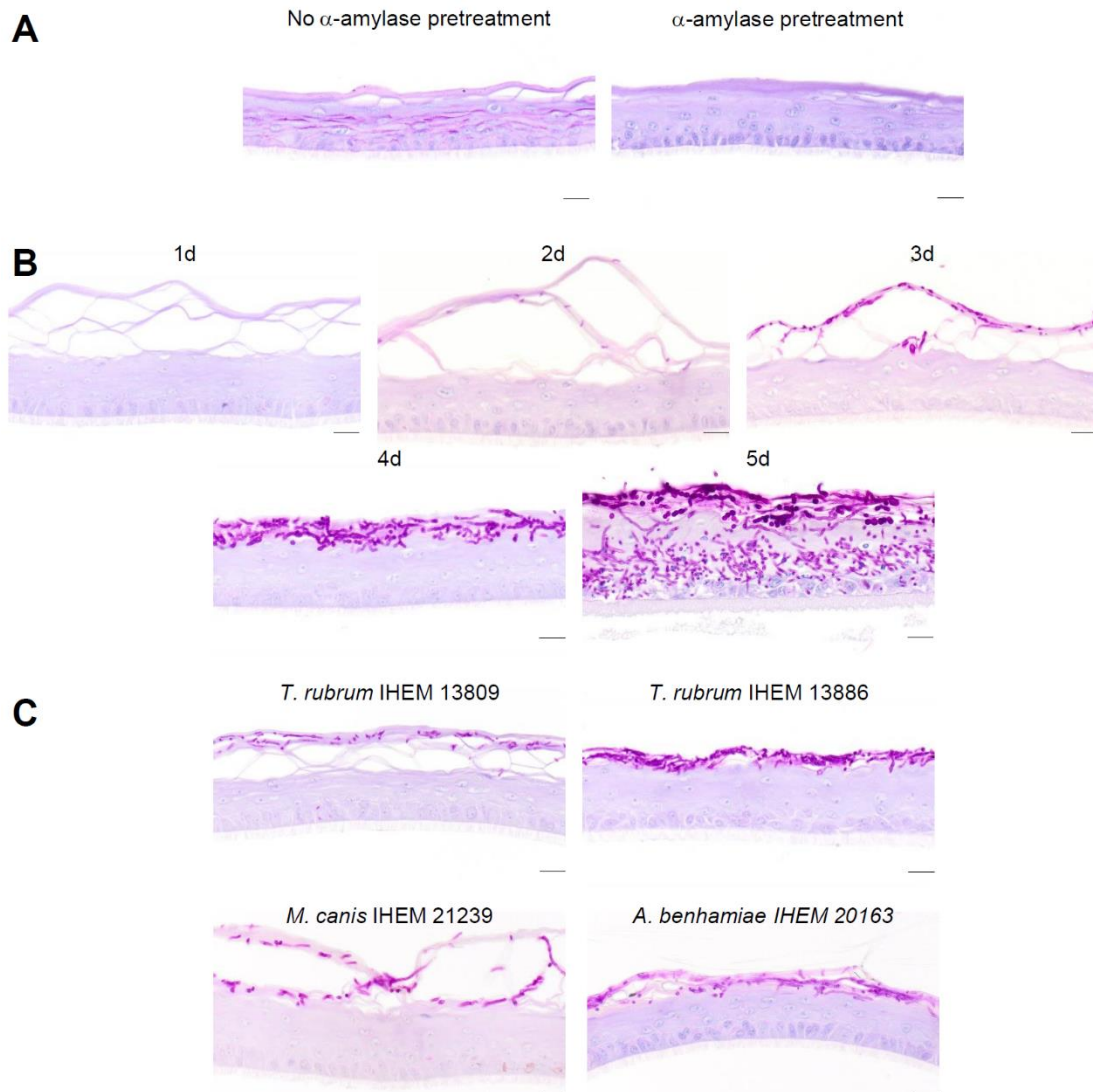


FIGURE 1: Infection of RHE using dermatophytes arthroconidia. Sections of non-infected control RHE at 11th day of reconstruction were histologically processed and stained by PAS with or without α -amylase pretreatment and with hemalun counterstaining. Prior digestion by α -amylase suppresses PAS signal in control RHE (**A**). RHE infected by arthroconidia of *T. rubrum* IHEM 13894 at a density of 1,700 /cm² were processed for histological analysis and stained by PAS with α -amylase pretreatment and hemalun counterstaining, one (1d), two (2d), three (3d), four (4d) or five (5d) days after inoculation (**B**). RHE infected by arthroconidia from two other strains of *T. rubrum*, namely IHEM 13809 or IHEM 13886 strain, at a density of 1,700 / cm², or by 17,000 arthroconidia of *M. canis* IHEM 21239 per cm² or by 53 arthroconidia of *A. benhamiae* IHEM 20163 per cm² were processed for histological analysis four days after inoculation (**C**). Scale bars: 20 μ m.

Quantification of infection by qPCR of *T. rubrum* 18S rDNA gene

We established a PCR-based method to quantify the infection of RHE by *T. rubrum* arthroconidia. Total DNA was extracted from infected RHE one, two, three and four days after inoculation and the copy number of *Tr* 18S rDNA was assessed by qPCR using a standard curve consisting in samples of known *Tr* 18S rDNA copy number. DNA extracted from non-infected RHE served as negative control.

Tr 18S rDNA copy number progressively increased during the four days following the inoculation corresponding to 38 ± 7 , 871 ± 329 , 24.704 ± 11.605 and 52.532 ± 24.523 respectively (**Figure 2**). This quantification was performed three times using RHE produced with keratinocytes isolated from three different donors, likely explaining the observed variability.

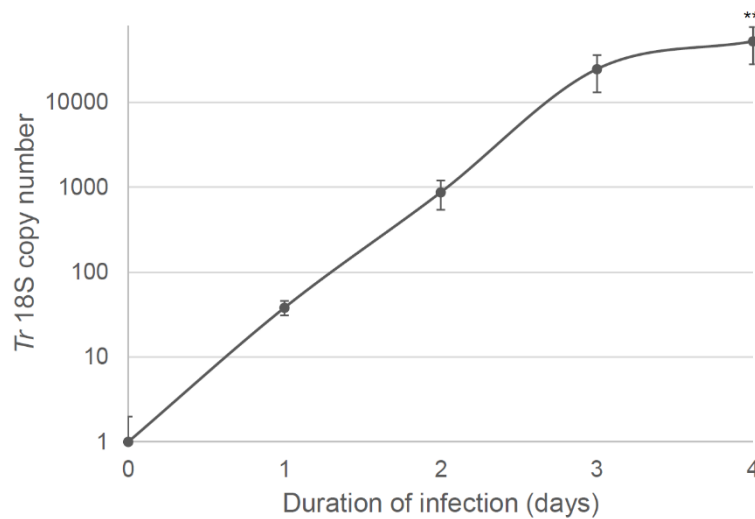


FIGURE 2: Infection of RHE is quantified by qPCR detection of *T. rubrum* 18S rDNA gene. RHE produced using keratinocytes from three different donors were infected by arthroconidia of *T. rubrum*. Each day during the four days following inoculation, DNA was extracted from infected RHE and *Tr* 18S rDNA copy number was determined by qPCR. DNA was also extracted from non-infected RHE before infection (0 day) and served as negative control ($n=3 \pm SD$; $**p<0.01$; ANOVA1).

Adhesion kinetics of *T. rubrum* arthroconidia to RHE

Adhesion kinetics of *T. rubrum* arthroconidia to RHE was studied by CFU counting. To perform this analysis, RHE inoculated with 1,700 *T. rubrum* arthroconidia per cm^2 were washed with PBS after 0, 1, 2, 4, 6 or 24 hours following inoculation. Non-adherent arthroconidia recovered in the solution used for these washes were seeded on Sabouraud dextrose agar and grown at 27°C for seven days. Numbers of CFU, corresponding to the number of non-adherent arthroconidia, were counted and subtracted from the number of arthroconidia inoculated on RHE in order to calculate the percentage of adherent arthroconidia. Percentage of adherent arthroconidia increases in accordance with duration of contact with RHE, starting from 1% only when

RHE were rinsed immediately, but reaching 91% when contact duration was 24 hours (**Figure 3A**).

Four days after inoculation, the histological analysis of RHE also revealed that the extent of invasion by arthroconidia increased with duration of contact (**Figure 3B**).

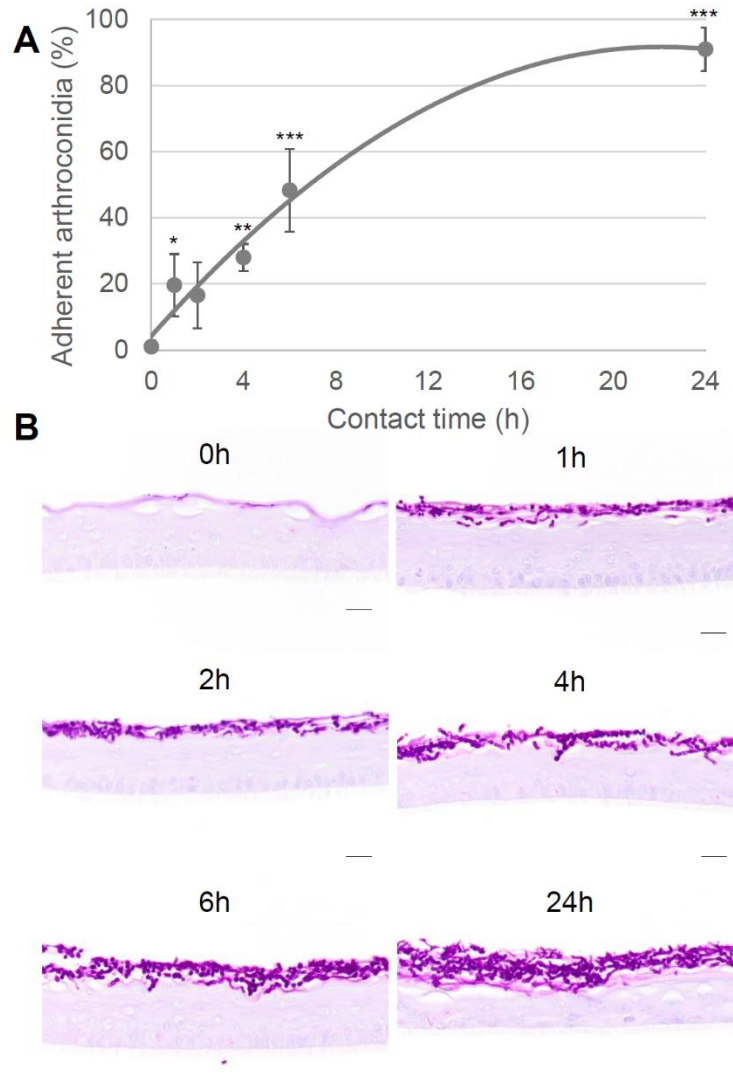


FIGURE 3: Adhesion kinetics of *T. rubrum* arthroconidia to RHE. RHE were infected by arthroconidia of *T. rubrum* (1,700/cm²). After 0, 1, 2, 4, 6 or 24h of contact time following inoculation, non-adherent arthroconidia were recovered by PBS washes and seeded on Sabouraud dextrose agar. Seven days later, CFU were counted and percentage of adherent arthroconidia was calculated. Statistical differences indicated on the graph were determined using RHE 0h as control (n=3 ± SD; *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001; ANOVA 1) (**A**). Infected RHE were collected four days after inoculation, processed for histological analysis and stained by PAS with α -amylase pretreatment and hemalun counterstaining (**B**). Scale bars: 20 μ m.

Miconazole inhibits infection of RHE by *T. rubrum* arthroconidia

Inhibitory activity of miconazole ³² was assessed on the RHE model of infection described above.

Firstly, minimum inhibitory concentration (MIC) of miconazole, defined as the lowest concentration able to prevent growth of *T. rubrum* arthroconidia, was determined. For this purpose, *T. rubrum* arthroconidia were seeded on Sabouraud dextrose agar in presence of miconazole at concentration ranging from 0.4 µg/ml to 6.4 µg/ml. Arthroconidia were grown during seven days at 27°C and then CFU were counted. Percentage of growth was determined as the percentage of seeded arthroconidia that have formed a colony. This percentage of growth was 100% in absence of miconazole and decreased in a dose-dependent manner in presence of miconazole (**Figure 4A**). At a concentration of 3.2 µg/ml, the percentage of growth dropped down to 0%, suggesting that 3.2 µg/ml was the MIC of miconazole. As a negative control, a PBS solution containing 6.4% DMSO, which is the highest concentration of the miconazole solvent, was found unable to alter *T. rubrum* growth.

A MTT assay demonstrated that, neither miconazole nor PBS solution containing DMSO, could alter keratinocyte survival (**Figure 4B**).

Finally, inhibitory effect of miconazole was checked using our model of RHE infection by *T. rubrum* arthroconidia. Two experimental settings were carried out. On one hand, miconazole was topically applied on RHE simultaneously with arthroconidia. On the second hand, miconazole was topically added on infected RHE one day after being inoculated with arthroconidia. In both experimental settings, RHE were exposed to air-liquid interface again four hours after miconazole application. RHE infected in the presence of miconazole were then processed for histological analysis four days after inoculation and compared with infected RHE cultured in absence of miconazole. In both experimental settings, miconazole effectively inhibited the infection of RHE by *T. rubrum* arthroconidia, as evidenced by the absence of fungal elements in the *stratum corneum*, four days after inoculation of RHE (**Figure 4C**). This result was confirmed by a huge decrease in *Tr* 18S rDNA copy numbers in presence of miconazole, measured by qPCR after total DNA extraction from infected RHE four days after inoculation (**Figure 4C**). An additional experimental setting was carried out in order to assess the efficacy of miconazole on previously infected RHE. Miconazole was topically applied on infected RHE four days after inoculation with arthroconidia, and reapplied each day up to the seventh day following inoculation. RHE were exposed to air-liquid interface again four hours after each miconazole application and were finally processed for histological analysis eight days after inoculation. Miconazole was able to stop the infection process, as shown by the limited extent of fungal invasion (**Figure 4D**). This was confirmed by measurement of *Tr* 18S rDNA copy numbers by qPCR after total DNA extraction from infected RHE eight days after inoculation (**Figure 4D**).

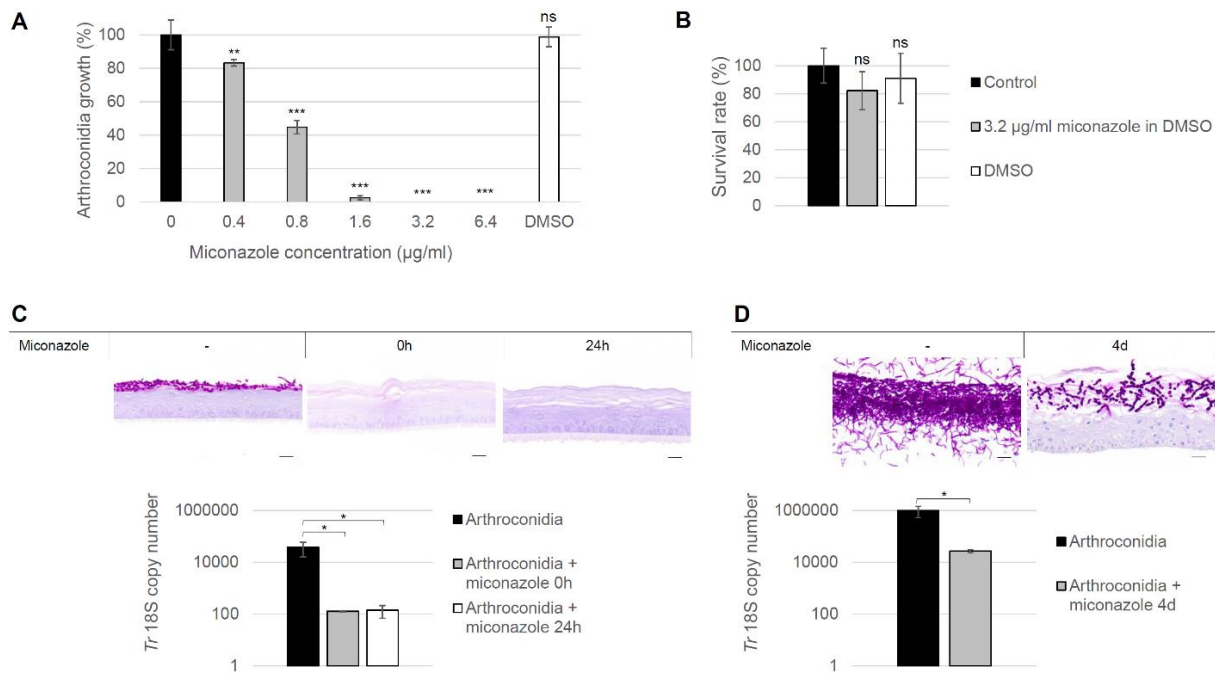


FIGURE 4: Inhibitory activity of miconazole on *T. rubrum* arthroconidia seeded on RHE. Arthroconidia of *T. rubrum* were seeded on Sabouraud dextrose agar in presence of different concentrations of miconazole. Seven days later, CFU were counted and arthroconidia growth was evaluated: miconazole at a concentration of 3.2 μg/ml inhibits arthroconidia's growth ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0.05$ $^{**}p < 0.01$ $^{***}p < 0.001$; ANOVA1) (**A**). In addition, neither miconazole at this concentration nor DMSO, which is the solvent of miconazole, has significant effect on RHE survival as demonstrated by MTT assay ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0.05$; ANOVA1) (**B**). RHE were infected by arthroconidia of *T. rubrum* only, or in presence of miconazole applied at the same time (0h) or applied 24h after infection (24h). Four days after inoculation, RHE were histologically processed and stained by PAS with α -amylase pretreatment and hemalun counterstaining (**C**). Scale bars: 20 μm. Total DNA was extracted from RHE four days after inoculation with arthroconidia of *T. rubrum* only (arthroconidia), or in presence of miconazole applied at the same time (arthroconidia + miconazole 0h) or applied 24h after infection (arthroconidia + miconazole 24h). Measurement of *T. rubrum* 18S rDNA gene copy number was then performed by qPCR ($n=3 \pm SD$; $^{*}p < 0.05$; ANOVA1) (**C**). In a second experimental setting, RHE were infected by arthroconidia of *T. rubrum* only, or in presence of miconazole applied four days after infection (4d). Eight days after inoculation, RHE were histologically processed and stained by PAS with α -amylase pretreatment and hemalun counterstaining (**D**). Scale bars: 20 μm. Total DNA was extracted from RHE eight days after inoculation with arthroconidia of *T. rubrum* only (arthroconidia), or in presence of miconazole applied four days after infection (arthroconidia + miconazole 4d). Measurement of *T. rubrum* 18S rDNA gene copy number was then performed by qPCR ($n=3 \pm SD$; $^{*}p < 0.05$; ANOVA1) (**D**).

Discussion

In this study, a model of dermatophytosis on RHE using the *T. rubrum* anthropophilic species, responsible for the majority of human infections, has been developed. A density of 1,700 arthroconidia per cm² allows infection of *stratum corneum* without invasion of deeper layers made of living keratinocytes during the four days following inoculation, as it happens *in vivo* in infected glabrous human skin. Obviously, infection of RHE becomes more severe than *in vivo* where only a few fungal elements are dispersed in the *stratum corneum*. As RHE in this model completely lack immune cells and serum, keratinocytes alone react to counteract the progression of arthroconidia into the living layers of the epidermis. Taking these parameters into account, the experimental conditions were chosen in order to obtain a significant infection, thereby facilitating the study of dermatophytosis pathogenesis and keratinocyte responses. Thus, this model seems representative of *in vivo* human skin infection by *T. rubrum* and is validated using three different strains of this species.

In addition, the model was adapted for two other dermatophyte species, namely *M. canis* and *A. benhamiae*, by adapting the initial number of arthroconidia used to infect RHE. Interestingly, the suitable size of inoculum varied considerably between species: 1,700 arthroconidia per cm² for *T. rubrum*, 17,000 for *M. canis* and 53 for *A. benhamiae*. Such a huge difference might potentially reflect variability in the processes involved during infection. Firstly, upon contact with host tissue components, different strains of pathogenic fungi express different adhesin genes. Moreover, different alleles encode adhesin proteins with variable number of tandem repeats, and in turn different adhesion properties, as shown for instance in clinical isolates of *C. albicans*³³. In *T. rubrum*, an adhesin-like protein with a tandem repeat pattern was recently reported as induced in conidia grown on keratin³⁴. Interestingly, homologous proteins with variable numbers of tandem repeats are found in different dermatophyte species, including *M. canis* and *A. benhamiae*. Secondly, other components involved in the host-pathogen interaction could be responsible for the difference in the number of fungal elements necessary to trigger infection, namely protease expression level and activity which are characteristic of individual dermatophyte species cultured *in vitro*³⁵. Thirdly, the difference in suitable inoculum size maybe reflects that the level of *in vivo* human skin infection is species-dependent, zoophilic species being more inflammatory than anthropophilic ones^{36,37}. Notably, *A. benhamiae* causes highly inflammatory human lesions, in good accordance with the *in vitro* observation that a small number of arthroconidia is sufficient to induce infection of RHE comparable to RHE infection by *T. rubrum*. Anyhow, these results suggest that infection model of RHE can easily be adapted to other dermatophyte species by modulating the size of inoculum.

Recently, two infection models by *T. rubrum* dermatophytes on living skin equivalent were reported. Firstly, Achterman *et al.*²³ infected commercially available EpiDerm tissues by conidia from *T. rubrum* as well as with four other different dermatophytes species (*T. tonsurans*, *T. equinum*, *M. canis* and *M. gypseum*). However, the size of inoculum was chosen in that report on the basis of lactate dehydrogenase release in

the culture medium of infected tissues as an indication of tissue damages. Since no morphological analysis was performed, the extent of infection has not been assessed. In addition, an equal number of conidia was used to infect tissues, irrespective of the species involved, whereas it is well known that the level of human skin infection is highly species-dependent^{36,37}. Notably zoophilic species, such as *M. gypseum*, give rise to more inflammatory lesions than anthropophilic fungi, like *T. rubrum* for instance. In another model, Liang *et al.*²⁴ used available commercial epidermal tissue EpiSkin to mimic human infection by *T. rubrum*. In that study, the authors have assessed tissues invasion by means of histological analysis. A drawback of those two models is the use of conidia as infecting fungal elements. These conidia are either pluricellular macroconidia or, more likely, unicellular microconidia. Both are saprophytic elements which are produced by anthropophilic dermatophytes exclusively in culture, and which have never been observed in dermatophytosis lesions *in vivo*. Oppositely, in the present model, the use of arthroconidia is more representative of *in vivo* infecting spores³⁸.

Further specificity was brought to RHE histological analysis by performing α -amylase pretreatment before proceeding to standard PAS-staining. Indeed suprabasal keratinocytes are highlighted by PAS staining in this model, but also in the two published models, due to yet unexplained presence of glycogen. This background signal is effectively eliminated by α -amylase treatment but was not taken into account in the previous studies^{23,24}.

In addition, a method based on qPCR to quantify the infection of RHE by dermatophytes has been developed herein. PCR methods are already used for detection of dermatophytes in diagnosis of human infection^{31,39,40}, but to our knowledge, absolute quantitation of infection has never been performed so far. This method allows to quantitatively evaluate the progression of infection by *T. rubrum* arthroconidia during the four days following inoculation of RHE. Furthermore, this method will nowadays be used as a sensitive measuring procedure, relevant to compare levels of adhesion and infection between different species and/or in different conditions, thus allowing assessment of the efficacy of putative antifungal compounds.

Adhesion kinetics of arthroconidia to RHE was assessed by CFU counting method. As expected, percentage of adherent arthroconidia increases according to the duration of contact. Accordingly, the analysis of infected RHE four days after inoculation revealed that the extent of infection is related to duration of contact between arthroconidia and tissue. Adhesion increases significantly after one hour, suggesting that it constitutes an early step of infection in accordance with previous studies^{15,41}. Even in RHE which were rinsed immediately after inoculation, morphological analysis revealed the presence of some fungal elements four days later. This could mean either that adhesion is an immediate process, or that washing procedure does not remove all arthroconidia from the RHE. However, no significant differences are observed between percentages of adherent arthroconidia after one, two and four hours of contact with RHE, indicating that at least six hours are needed to reach high levels of adhesion.

Finally, the efficacy of miconazole in suppressing the infection of RHE by *T. rubrum* arthroconidia was confirmed by morphological and qPCR analyses. These results prove that this model is a valid tool to assess the efficiency of new potential anti-dermatophyte compounds. In the past, dermatophytosis models on skin equivalent were already used to test the efficacy of antifungal agents ^{25,26}. In those studies, antifungal molecules were added in culture media of reconstructed epidermis to mimic systemic administration. On the contrary, miconazole was hereby topically applied on the *stratum corneum*. In the current context, where new drugs against dermatophytosis are requested, the development of a human model allowing efficiency tests of topical therapeutic or preventive novel agents is highly relevant.

In summary, a dermatophytosis model on RHE and two methods to quantify infection have been successfully developed. These tools allow the study of direct interactions between dermatophytes and keratinocytes as well as the evaluation of efficacy for putative antifungal agents. However RHE, as other skin equivalent models, present several unavoidable limitations. Indeed, absence of skin appendages, sebum, cutaneous microflora and immune system makes RHE more susceptible to fungal infection than *in vivo* human skin. Consequently, analysis of infected RHE in our model occurs four days after inoculation, well before dermatophytes start to invade layers of living keratinocytes and finally destroy the full epidermis. Despite these limitations, the present model brings improvements to already available tools dedicated to better understanding epidermal involvements of dermatophytes, as well as to evaluate novel preventive or therapeutic antifungal agents.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the technical help provided by B. Balau, V. De Glas, K. De Swert and D. Van Vlaender. Special thanks are addressed to Dr B. Bienfait (Clinique St. Luc, Namur-Bouge, Belgium) for providing skin samples. EF is supported by a research fellowship (MYCAVERT, convention 1318058) from the *Région Wallonne*.

Conflict of interest

None.

References

1. Weitzman I, Summerbell R. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev.* 1995; **8**: 240-259
2. Smith K, Welsh M, Skelton H. *Trichophyton rubrum* showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients. *Br J Dermatol.* 2001; **145**: 344-348
3. Cheng C, Hsiao Y, Ko. J. Disseminated deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. *Dermatol Sin.* 2014; **32**: 191-192
4. Squeo R, Beer R, Silvers D, Weitzman I, Grossman M. Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. *J Am Acad Dermatol.* 1998; **39**: 379-380
5. Carlisle D, Inouye J, King R, Jones H. Significance of serum fungal inhibitory factor in dermatophytosis. *J Invest Dermatol.* 1974; **63**: 239-241
6. Havlickova B, Czaika V, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses.* 2008; **51**: 2-15
7. Seebacher C, Bouchara J-P, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia.* 2008; **166**: 335-352
8. Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz H. Mycology- an update. Part 1: dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014; **1610-0379**: 188-205
9. Bagut E, Baldo A, Mathy A, et al. Subtilisin Sub3 is involved in adherence of *Microsporum canis* to human and animal epidermis. *Vet Microbiol.* 2012; **160**: 413-419
10. Baldo A, Chevigné A, Dumez M, et al. Inhibition of the keratinolytic subtilisin protease Sub3 from *Microsporum canis* by its propeptide (proSub3) and evaluation of the capacity of proSub3 to inhibit fungal adherence to feline epidermis. *Vet Microbiol.* 2012; **159**: 479-484
11. Baldo A, Mathy A, Tabart J, et al. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. *Br J Dermatol.* 2010; **162**: 990-997
12. Baldo A, Monod M, Mathy A, et al. Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses.* 2012; **55**: 218-223
13. Osborne C, Leitner I, Favre B, Ryder N. Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* epoxidase associated with resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; **49**: 2840-2844
14. Mukherjee P, Leidich S, Isham N, Leitner I, Ryder N, Ghannoum M. Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; **47**: 82-86
15. Zurita J, Hay R. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes *in vitro*. *J Invest Dermatol.* 1987; **89**: 529-534
16. Grumbt M, Monod M, Yamada T, Hertweck C, Kunert J, Staib P. Keratin degradation by dermatophytes relies on dioxygenase and sulfite efflux pump. *J Invest Dermatol.* 2013; **133**: 1550-1555
17. Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Watanabe S. Interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; **9**: 935-937
18. Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol.* 2006; **55**: 1175-1185

19. Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J Infect.* 2004; **48**: 175-180
20. Kaufman G, Horwitz B, Duek L, Ullman Y, Berdicevsky I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Med Mycol.* 2007; **45**: 149-155
21. Peres N, da Silva L, da Silva Santos R, et al. *In vitro* and *ex vivo* infection models help assess the molecular aspects of the interaction of *Trichophyton rubrum* with the host milieu. *Med Mycol.* 2016; **54**: 420-427
22. Tabart J, Baldo A, Vermout S, et al. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporum canis* dermatophytosis. *J Med Microbiol.* 2007; **56**: 971-975
23. Achterman R, Moyes D, Thavaraj S, et al. Dermatophytes activate skin keratinocytes via mitogen-activated protein kinase signaling and induce immune responses. *Infect Immun.* 2015; **83**: 1705-1714
24. Liang P, Huang X, Yi J, et al. A *Trichophyton rubrum* infection model based on the reconstructed human epidermis – Episkin®. *Chin Med J.* 2016; **129**: 54-58
25. Rashid A, Edward M, Richardson M. Activity of terbinafine on *Trichophyton mentagrophytes* in human living skin equivalent model. *J Med Vet Mycol.* 1995; **33**: 229-233
26. Tabart J, Baldo A, Vermout S, Losson B, Mignon B. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for the screening of antifungal drugs against *Microsporum canis*. *Vet Dermatol.* 2008 ; **19**: 130-133
27. De Vuyst E, Charlier C, Giltaire S, De Glas V, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods Mol Biol.* 2014; **1195**: 191-201
28. Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Hérin M, Coquette A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in *in vitro* studies. *Arch Dermatol Res.* 2004; **296**: 203-211
29. Frankart A, Malaisse J, De Vuyst E, Minner F, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. Epidermal morphogenesis during progressive *in vitro* 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp dermatol.* 2012; **21**: 871-875
30. Frankart A, Coquette A, Schroeder K-R, Poumay Y. Studies of cell signaling in a reconstructed human epidermis exposed to sensitizers: IL-8 synthesis and release depend on EGFR activation. *Arch Dermatol Res.* 2012; **304**: 289-303
31. Paugam A, L'Ollivier C, Viguié C, et al. Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *J Microbiol Methods.* 2013; **95**: 218-222
32. Barasch A, Voinea Griffin A. Miconazole revisited: new evidence of antifungal efficacy from laboratory and clinical trials. *Future Microbiol.* 2008; **3**: 265-269
33. Verstrepen K, Klis F. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol.* 2006; **60**: 5-15
34. Bitencourt, T, Macedo, C, Franco M, et al. Transcription profile of *Trichophyton rubrum* conidia grown on keratin reveals the induction of an adhesin-like protein gene with a tandem repeat pattern. *BMC Genom.* 2016; **17**: 249
35. Giddey, K, Frave, B, Quadroni, M, Monod, M. Closely related dermatophyte species produce different patterns of secreted proteins. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; **267**: 95-101
36. Noguchi H, Jinnin M, Miyata K, Hiruma M, Ihn H. Clinical features of 80 cases of *tinea faciei* treated at a rural clinic in Japan. *Drug Discov Ther.* 2014; **8**: 245-248

37. Degreeef H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia*. 2008; **166**: 257-265
38. Rashid A. Arthroconidia as vector of dermatophytosis. *Cutis* 2001; **67**
39. Dhib I, Fathallah A, Charfeddine I, et al. Evaluation of Chitine synthase (CHS1) polymerase chain reaction assay in diagnosis of dermatophyte onychomycosis. *J Mycol Med*. 2012; **22**: 249-255
40. Ohst T, Kupusch C, Gräser Y. Detection of common dermatophytes in clinical specimens using a simple quantitative real-time TaqMan PCR assay. *Br J Dermatol*. 2015; **174**: 602-609
41. Baldo A, Tabart J, Vermout S, et al. Secreted subtilisins of *Microsporum canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. *J Med Microbiol*. 2008; **57**: 1152-1156

1. Matériel et méthodes additionnels

Dénombrement des arthrospores

Classiquement, les arthrospores sont dénombrées par ensemencement sur gélose de Sabouraud et comptage des unités formant colonies (CFU pour *colony-forming unit*). Le risque avec cette méthode serait que certaines arthrospores ensemencées sur Sabouraud ne développent pas de colonies et ne soient donc pas prises en compte. Afin de valider la méthode par comptage des CFU sur Sabouraud, les arthrospores ont également été dénombrées par cytométrie après observation au microscope à contraste de phase. Pratiquement, les arthrospores en suspension ont été ensemencées sur gélose de Sabouraud ou simultanément déposées sur lame de comptage (KOVA® Glasstic® Slide 10, Hycor Biomedical cat. no. 87157) pour analyse grâce à un microscope à contraste de phase. Alors que la cytométrie a été réalisée immédiatement, les CFU ont été comptées après 7 jours d'incubation à 27°C. Le nombre d'arthrospores dénombrées par la méthode des CFU a été arbitrairement fixé à 100%. Il apparaît que le comptage des arthrospores par cytométrie est moins sensible que le comptage des CFU sur Sabouraud (**Figure S1**). La méthode de dénombrement des arthrospores par comptage des CFU a donc été retenue et utilisée en routine pour la suite des dénombrements.

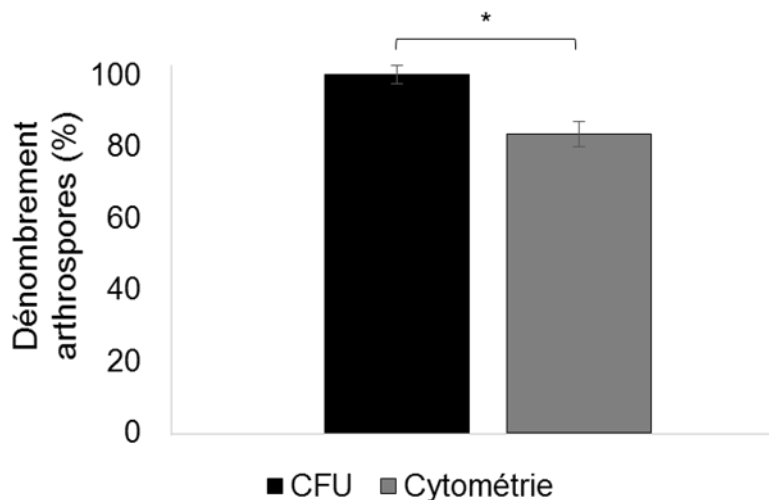


Figure S1. Dénombrement des arthrospores par comptage des unités formant colonies (CFU) sur gélose de Sabouraud ou par comptage des arthrospores par cytométrie après observation au microscope à contraste de phase ($n=3 \pm SD$; $*p<0,05$; t -Student).

Spécificité des amorces pour la PCR quantitative

La séquence de l'ADN ribosomique (ADNr) de dermatophyte amplifiée par les amorces 18SrDNA-F et 18SrDNA-R, utilisées pour la PCR quantitative (qPCR), ainsi que l'électrophorèse en gel d'agarose afin de vérifier la spécificité de ces amorces sont illustrées dans la **Figure S2**.

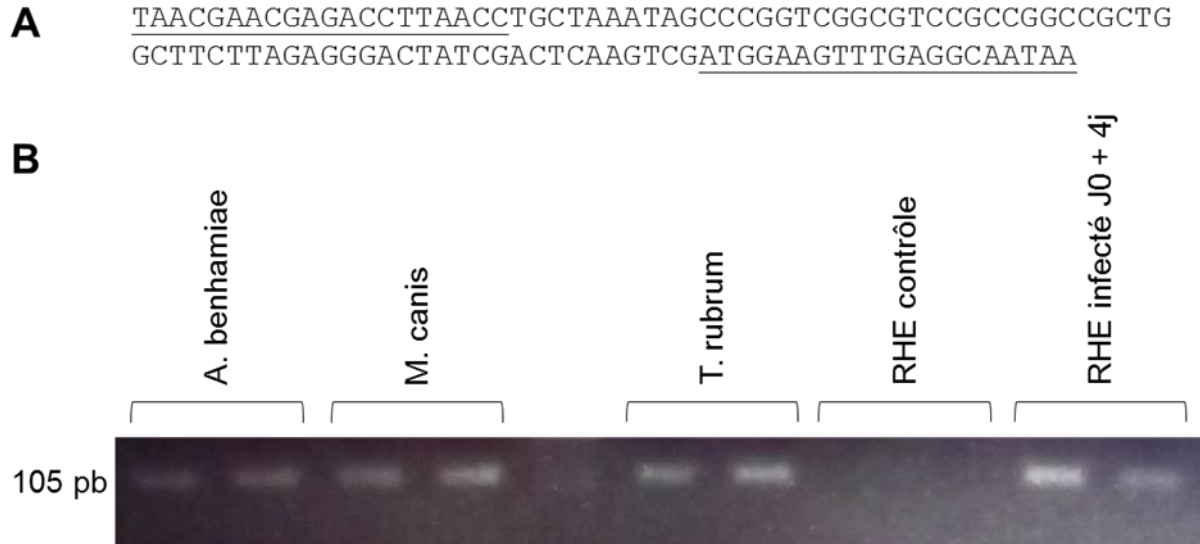


Figure S2. (A) Fragment de 105 paires de bases de la séquence de l'ADN ribosomique 18S de dermatophytes, conservé entre plusieurs espèces dont *Arthroderma benhamiae*, *Microsporum canis* et *Trichophyton rubrum*, qui est amplifié par les amorces 18SrDNA-F (5-TAACGAACGAGACCTTAACC-3) et 18SrDNA-R (5-TTATTGCCTCAAACCTTCAT-3) utilisées pour la quantification par qPCR des individus fongiques infectant les RHE. **(B)** Electrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification du gène de l'ADNr 18S de dermatophyte analysés à partir de l'ADN extrait des mycéliums d'*A. benhamiae*, *M. canis* ou *T. rubrum*, ou de RHE non-infectés (contrôle), ou de RHE récupérés quatre jours après leur infection par les arthrospores de *T. rubrum* (J0 + 4j). Les fragments d'ADN sont visualisés sous lampe UV après incubation avec du bromure d'éthidium.

Test d'activité enzymatique de Sub3 et inhibition par la chymostatine

L'activité enzymatique de la protéase recombinante Sub3 de *T. rubrum* ou de *M. canis* peut être mesurée en utilisant le substrat synthétique AAPF-pNa (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-P-nitroanilide Sigma cat. no. S7388). En effet, le clivage protéolytique de ce substrat par Sub3 libère la 4-nitroaniline qui produit une coloration jaune en conditions alcalines permettant de déterminer la concentration dans le milieu réactionnel par mesure de l'absorbance à 405 nm. Comme étalon, une préparation de protéase Sub3 recombinante (concentration finale de 0,55 μ M) est incubée en présence de 1 mM de substrat AAPF-pNa dans du tampon tris 50 mM (pH 8). Ce mélange réactionnel est alors incubé à température ambiante pendant 5 minutes avant lecture de l'absorbance à 405 nm. L'activité de Sub3 mesurée dans ces conditions est fixée à 100%.

L'inhibition de Sub3 par la chymostatine est établie par ajout de 100 μ M de chymostatine au mélange réactionnel contenant la protéase recombinante et le substrat AAPF-pNa. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance de la solution à 405 nm est mesurée et le pourcentage d'activité résiduelle de Sub3 en présence de chymostatine est calculé par rapport à l'activité de la protéase en absence de cet inhibiteur.

Microscopie électronique à balayage

Pour l'analyse en microscopie électronique à balayage (MEB), les RHE infectés ont été fixés pendant quatre heures à 4°C dans le glutaraldéhyde dilué à 2,5% dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7,4). Les RHE ont ensuite été rincés trois fois dans du tampon cacodylate 0,2 M (pH 7,4) avant d'être déshydratés par des bains successifs d'éthanol en concentration croissante d'alcool (30 – 100%). Après séchage par la méthode du point critique, les échantillons sont recouverts d'une fine couche d'or pour observation de la surface des RHE grâce au microscope électronique à balayage (JSM-7500F, JEOL, Tokyo, Japan).

2. Résultats additionnels

Infection des épidermes humains reconstruits

Les RHE infectés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de 1.700 par cm² ont été récupérés pour analyse morphologique après six et sept jours (**Figure S3**).

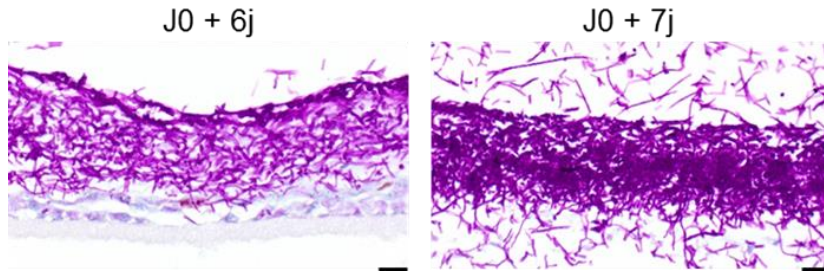


Figure S3 : Coloration par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalun des RHE six (J0 + 6j) et sept (J0 + 7j) jours après leur infection par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de 1.700 par cm². Barres d'échelle : 20 μ m.

Le modèle d'infection a été validé pour deux autres souches de l'espèce *T. rubrum* (**Figure S4 A et B**) et pour les espèces *M. canis* (**Figure S4 C**) et *A. benhamiae* (**Figure S4 D**).

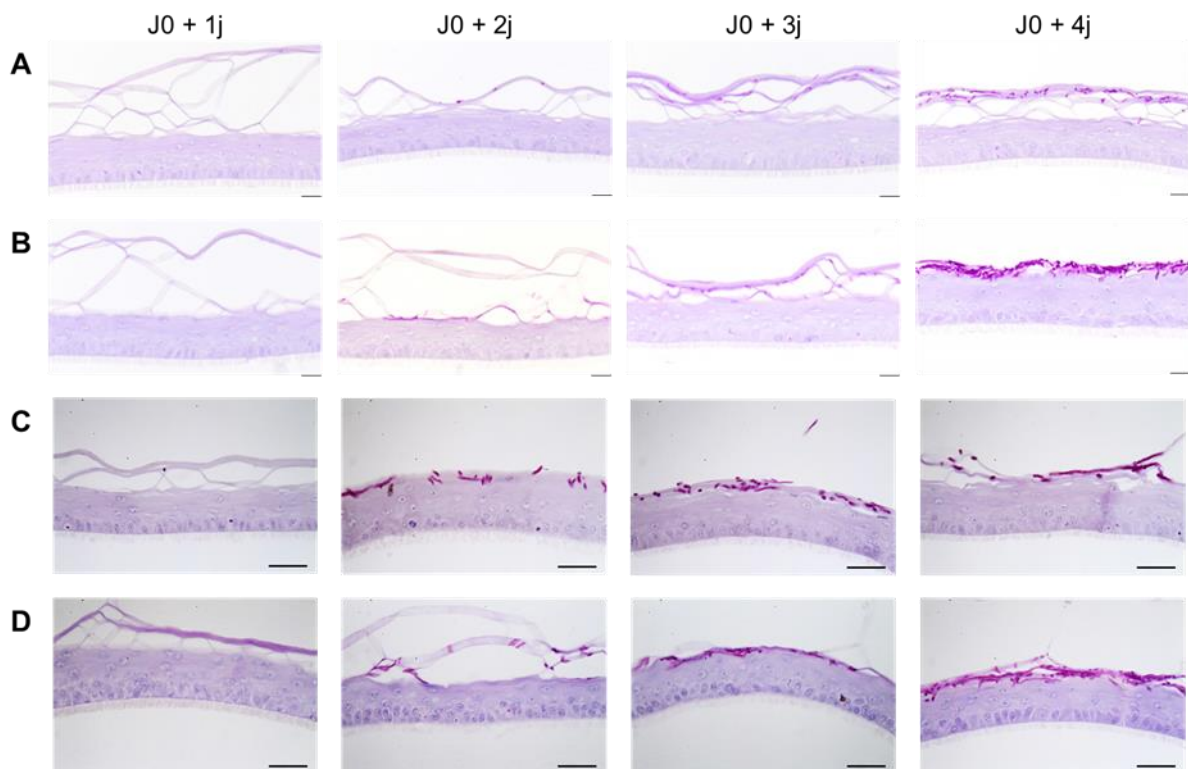


Figure S4 : Coloration par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalun des RHE un (J0 + 1j), deux (J0 + 2j), trois (J0 + 3j) ou quatre (J0 + 4j) jours après leur infection par les arthrospores de *T. rubrum* (**A**) IHEM 13809 ou (**B**) IHEM 13886 à une densité de 1.700 par cm², ou par les arthrospores (**C**) de *M. canis* IHEM 21239 à une densité de 17.000 par cm² ou (**D**) d'*A. benhamiae* IHEM 20163 à une densité de 53 par cm². Barres d'échelle : 50 μ m.

Cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE

Les RHE ont été infectés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de 1.700 par cm² et les rinçages au PBS (*phosphate-buffered saline*) ont été effectués immédiatement (0 h) ou après 1, 2, 4, 6 ou 24 h, correspondant à la durée du contact entre les arthrospores et les épidermes. Les RHE infectés ont ensuite été incubés à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂ pendant quatre jours additionnels au terme desquels ils ont été récupérés afin d'en extraire l'ADN total. Le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* a alors été déterminé par qPCR afin d'évaluer le taux d'infection des RHE en fonction de la durée du contact (**Figure S5**). Le taux d'infection des RHE après quatre jours augmente en fonction de la durée du contact entre épiderme et arthrospores.

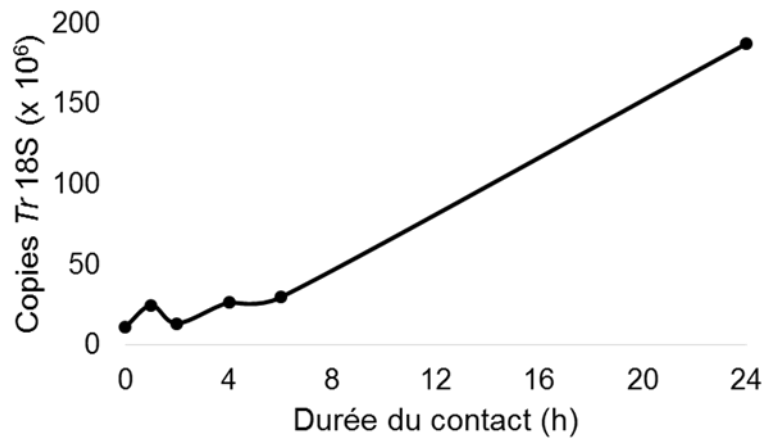


Figure S5 : Quantification par qPCR du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* (*Tr 18S*) quatre jours après l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de 1.700 par cm² en fonction de la durée du contact entre arthrospores et RHE.

Implication de Sub3 dans l'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE

Bagut et collaborateurs ont précédemment démontré l'implication de la protéase à sérine de type subtilisine Sub3 dans l'adhérence des arthrospores de *M. canis* à la peau de différentes espèces animales dont l'homme (Bagut 2012). L'implication de cette protéase fongique dans l'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* à l'épiderme humain a dès lors été évaluée en utilisant le modèle d'infection sur RHE. Pour ce faire, la chymostatine, qui est un inhibiteur des protéases à sérine, a été employée.

Premièrement, la capacité de la chymostatine à conserver son pouvoir inhibiteur de Sub3 au contact des RHE a été vérifiée par un test d'activité enzymatique de Sub3 utilisant le substrat synthétique AAPF-pNa (**Figure S6 A**). En pratique, la chymostatine est utilisée à une concentration de 100 µM soit immédiatement après sa sortie du frigo (condition optimale), soit après 4 h d'incubation à 37°C, soit après 4 h d'incubation en application topique sur les RHE à 37°C. La chymostatine est ensuite récupérée et mise en présence de la protéase Sub3 et du substrat artificiel AAPF-pNa. La chymostatine inhibe effectivement l'activité de Sub3 à plus

de 90% ; en effet les activités résiduelles des protéases recombinante Sub3 de *T. rubrum* et de *M. canis* sont respectivement de 4% et 7% en présence de chymostatine en condition optimale. La chymostatine conserve un pouvoir inhibiteur de Sub3 de plus de 90% après 4 h d'incubation à 37°C ou en application topique sur RHE.

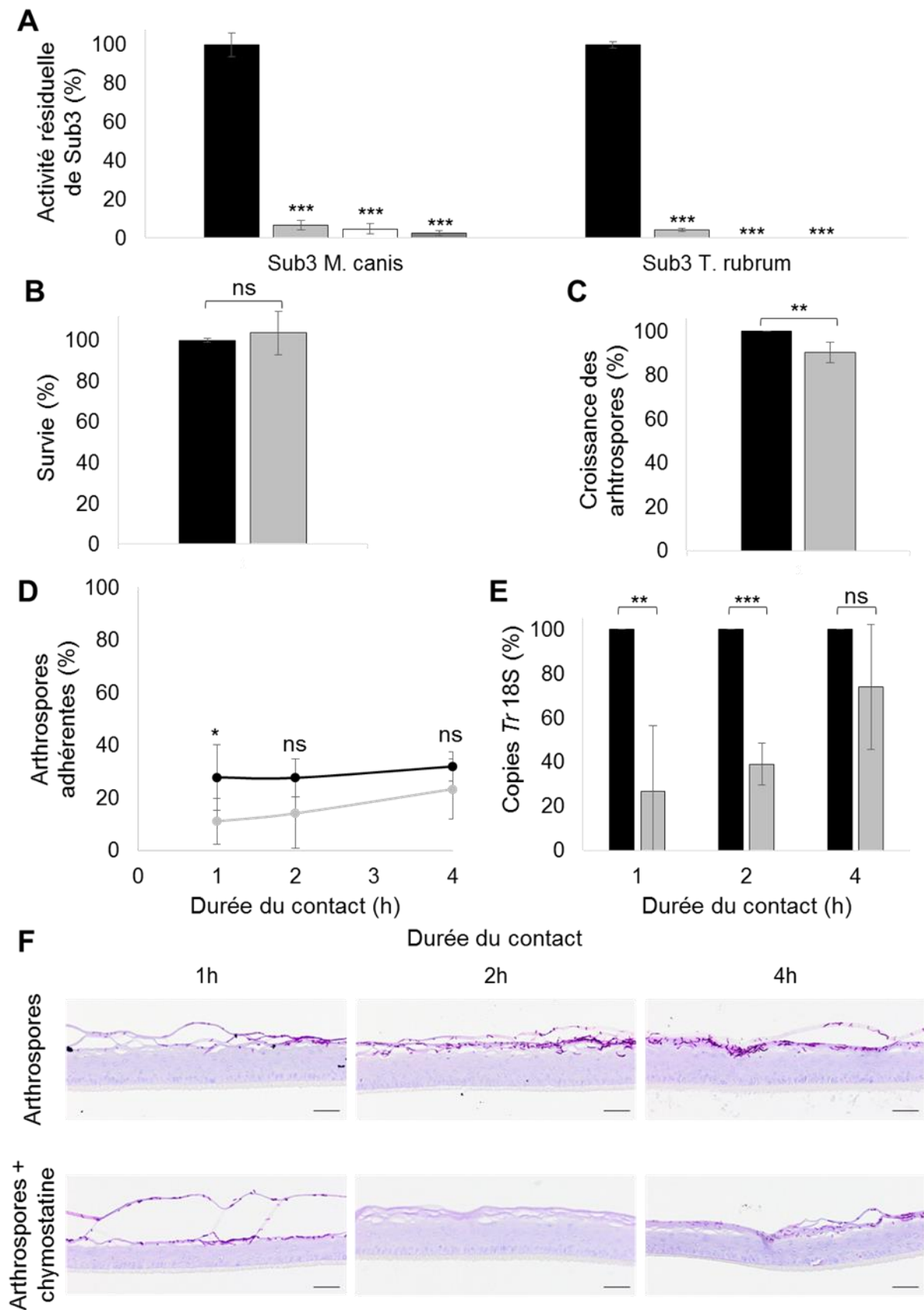
Deuxièmement, un test de viabilité a démontré que la chymostatine, à la concentration de travail de 100 µM, n'a pas d'impact significatif sur la survie des RHE (**Figure S6 B**). En pratique, la chymostatine a été appliquée de manière topique sur des RHE qui ont ensuite été soumis à un test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) après 4 heures d'incubation à 37°C. Le pourcentage de survie des RHE en présence de chymostatine a été calculé par rapport à la viabilité des RHE contrôles non traités.

Finalement, l'effet potentiel de la chymostatine sur la croissance des arthrospores de *T. rubrum* a été évalué par dénombrement des CFU formées sur gélose de Sabouraud sept jours après ensemencement des arthrospores seules ou en présence de 100 µM chymostatine (**Figure S6 C**). La chymostatine réduit la croissance des arthrospores de 10%. Cet impact de la chymostatine sur la croissance des arthrospores de *T. rubrum* a donc été pris en compte pour le dénombrement des CFU lors de l'évaluation du pourcentage d'adhérence des arthrospores sur RHE.

La chymostatine conservant son pouvoir inhibiteur de Sub3 en présence des RHE et n'ayant pas d'impact significatif sur la survie de ceux-ci, des tests d'infection en présence de chymostatine ont été réalisés.

Les RHE ont été infectés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de 1.700 par cm² seules (contrôle) ou en présence de 100 µM de chymostatine. Les arthrospores non-adhérentes ont été récupérées au cours des rinçages réalisés 1, 2 ou 4 heures après l'infection puis ensemencées sur gélose de Sabouraud. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les CFU ont été dénombrées et le pourcentage d'adhérence a pu être calculé (**Figure S6 D**). En parallèle, les épidermes infectés ont été maintenus en culture pendant quatre jours additionnels et finalement récupérés afin d'en extraire l'ADN total et de quantifier le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* (**Figure S6 E**). Une analyse morphologique du niveau d'invasion des RHE par les éléments fongiques a également été réalisée par coloration histochimique par le PAS, quatre jours après l'infection (**Figure S6 F**).

Le pourcentage d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE est réduit en présence de chymostatine et cette diminution est statistiquement significative lorsque la durée du contact est d'une heure. Le taux d'infection des RHE, déterminé par qPCR au quatrième jour d'infection, est également diminué en présence de chymostatine et de façon statistiquement significative lorsque les rinçages sont effectués une ou deux heures après l'infection. Enfin, bien que les marquages histochimiques ne soient pas quantitatifs, l'invasion des épidermes quatre jours après l'infection semble moins étendue en présence de chymostatine.



↓ Figure S6.

↑ **Figure S6. (A)** Activité résiduelle de la protéase Sub3 de *T. rubrum* ou de *M. canis* seule (noir), en présence de chymostatine en condition optimale (gris clair), ou après incubation 4h à 37°C (blanc) ou après 4h d'incubation en topique sur les RHE à 37°C (gris foncé) ($n=3 \pm \text{SD}$; *** $p<0,001$; ANOVA1). **(B)** Pourcentage de survie des RHE après 4 heures d'incubation en présence de chymostatine en application topique (gris) par rapport à des RHE contrôles non-traités (noir) ($n=3 \pm \text{SD}$; $^{ns}p\geq 0,05$; *t*-Student). **(C)** Pourcentage de croissance des arthrospores de *T. rubrum* sur gélose de Sabouraud seules (noir) ou en présence de chymostatine (gris) ($n=4 \pm \text{SD}$; ** $p<0,01$; *t*-Student). **(D)** Pourcentage d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* au RHE en présence (gris) ou non (noir) de chymostatine en fonction de la durée du contact ($n=3 \pm \text{SD}$; * $p<0,05$ $^{ns}p\geq 0,05$; *t*-Student). **(E)** Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* quatre jours après l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* en présence (gris) ou non (noir) de chymostatine, en fonction de la durée du contact. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de copies de l'ADNr 18S détectés dans les RHE infectés en absence de chymostatine ($n=3 \pm \text{SD}$; ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ $^{ns}p\geq 0,05$; *t*-Student). **(F)** Coloration histochimique par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE infectés par les arthrospores de *T. rubrum* en présence ou non de chymostatine, en fonction de la durée du contact. Barres d'échelles : 50 μm .

Germination des arthrospores de *T. rubrum* sur RHE

Les RHE infectés par les arthrospores de *T. rubrum* ont été récupérés après 1, 2, 4 ou 6 heures de contact et l'analyse des échantillons par MEB a permis d'évaluer l'état de germination des arthrospores ayant adhéré en surface de l'épiderme (**Figure S7**). Endéans les deux premières heures suivant l'infection, les arthrospores en surface des épidermes présentent une forme cylindrique (**Figure S7 A et B**). Après quatre heures, les arthrospores semblent gonflées (**Figure S7 C**) et l'émergence de tubes germinatifs devient observable (**Figure S7 D**). Après six heures, les arthrospores forment des hyphes allongées présentant des septa (**Figure S7 E**) et celles-ci continuent leur croissance apicale (**Figure S7 F**).

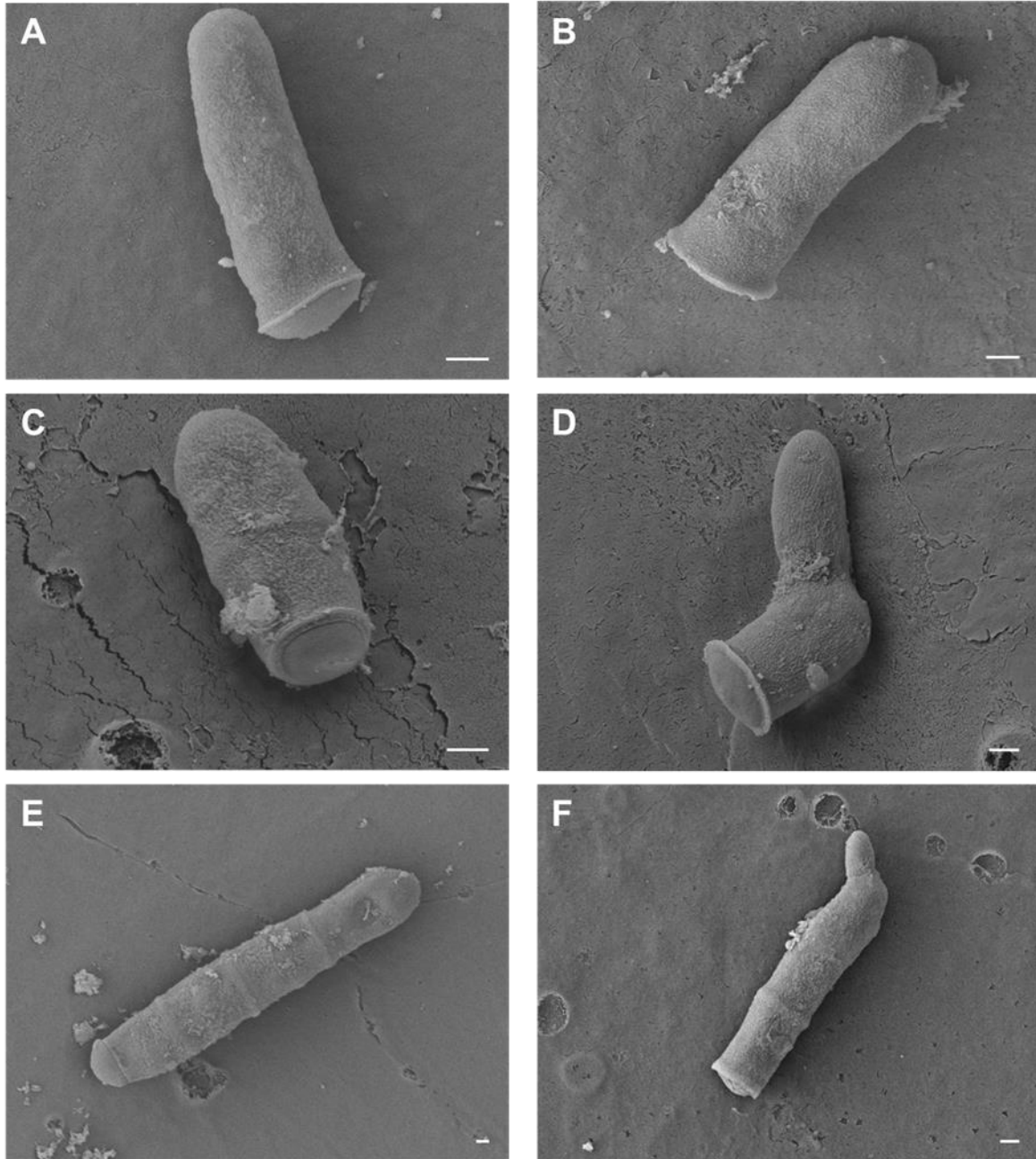


Figure S7 : Analyse morphologique par microscopie électronique à balayage de la surface des RHE infectés, réalisée (A) une, (B) deux, (C-D) quatre ou (E-F) six heures après l'infection. Barres d'échelles : 1 µm.

Effet du miconazole sur la viabilité des RHE

La présence de miconazole en application topique sur les RHE n'impacte pas la survie de ceux-ci (**Figure S8**).

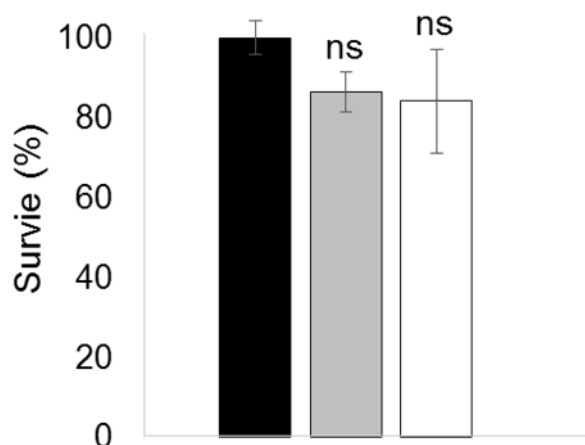


Figure S8 : Pourcentage de survie des RHE déterminé par test MTT, après 4 heures d'incubation en présence de 3,2 µg/ml de miconazole (gris) ou de 3,2% de DMSO (diméthylsulfoxyde) (blanc) qui est le solvant du miconazole, en application topique, par rapport à des RHE contrôles non-traités (noir) ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0,05$; t -Student).

Infection d'explants cutanés humains par les arthrospores de *T. rubrum*

Des explants cutanés humains, obtenus à la suite d'abdominoplasties (Dr. Bienfait, Clinique St. Luc, Namur-Bouge, Belgique), ont été placés dans des inserts de culture (CellCrown™ 24, Scaffdex cat. no. C00001N), eux-mêmes déposés dans du milieu de culture EpiLife supplémenté en HKGS et contenant 1,5 mM de Ca^{2+} . Après exposition à l'interface air-liquide, ces explants cutanés ont été infectés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 en utilisant le même protocole que pour l'infection des RHE. Les explants infectés ont été analysés un, deux, trois, quatre, six ou huit jours après infection afin d'évaluer le niveau d'invasion du tissu par les arthrospores de *T. rubrum* par coloration histochimique au PAS (**Figure S9**). Les éléments fongiques envahissent progressivement la couche cornée des explants cutanés durant les quatre premiers jours suivant l'infection, avant de pénétrer dans les couches plus profondes de kératinocytes vivants.

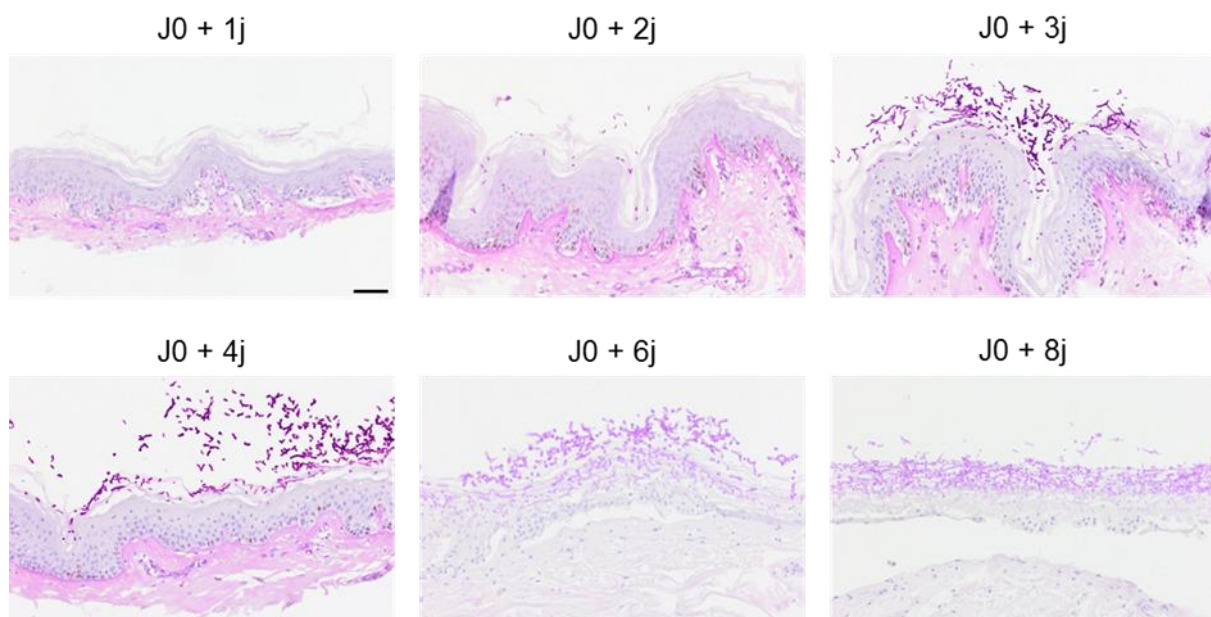


Figure S9 : Coloration histochimique par le PAS avec contre-coloration à l'hémalum des explants cutanés un (J0 + 1j), deux (J0 + 2j), trois (J0 + 3j), quatre (J0 + 4j), six (J0 + 6j) ou huit (J0 + 8j) jours après infection par les arthrospores de *T. rubrum* à une densité de 1.700 par cm^2 . A noter que les explants récupérés après six et huit jours ont également subi un prétraitement à l' α -amylase. Barre d'échelle : 50 μm .

PARTIE 2 : Etude de l'impact de l'infection sur la barrière épidermique et réponse des kératinocytes

Dans la seconde partie de cette thèse, le modèle d'infection par les arthrospores du dermatophyte anthropophile *Trichophyton rubrum* sur épiderme humain reconstruit (RHE) (voir **PARTIE 1 : Mise au point et caractérisation d'un modèle d'infection par le dermatophyte anthropophile *Trichophyton rubrum* sur épiderme humain reconstruit**) a été utilisé pour étudier d'une part, l'impact de l'infection sur le tissu épidermique hôte et son invasion par les éléments fongiques et d'autre part, les réponses précoces produites par les kératinocytes face à l'infection.

Des tests de barrière, à savoir les mesures de la résistance électrique transépithéliale, de la perméabilité *outside-in* à la sonde fluorescente Lucifer Yellow et de perméabilité *inside-out* à la biotine, ont permis d'évaluer l'efficacité de la barrière épidermique des RHE au cours de l'infection. Simultanément, la localisation de la claudine-1 (cldn-1), protéine des jonctions étanches (TJ), a été établie par immunomarquage. D'autre part, l'invasion des RHE par *T. rubrum* a été caractérisée par l'observation morphologique en microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET). Des cytokines pro-inflammatoires et des peptides antimicrobiens (PAM) exprimés et libérés par les kératinocytes au cours de l'infection des RHE ont quant à eux été investigués à la fois par RT-qPCR après extraction de l'ARN et par tests ELISA sur les milieux de culture. Enfin, le rôle potentiel de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38 dans la perte de barrière et dans la réponse des kératinocytes durant l'infection des RHE a été évalué après son inhibition spécifique par le PD169316. L'effet de cet inhibiteur sur la croissance de *T. rubrum* sur gélose de Sabouraud a également été étudié par dénombrement et observation en MEB des unités formant colonies.

L'intégrité de la barrière épidermique des RHE est rompue au quatrième jour suivant leur infection par les arthrospores de *T. rubrum*. Cette rupture soudaine de la barrière épidermique résulte d'une perte d'efficacité des TJ, due au moins en partie à une relocalisation de la cldn-1. Les hyphes produites au départ des arthrospores de *T. rubrum* pénètrent et envahissent la couche cornée des RHE en progressant dans les espaces intercellulaires entre les cornéocytes. Les kératinocytes réagissent quant à eux à l'infection en augmentant l'expression et la libération de cytokines pro-inflammatoires et de PAM, quatre jours après l'infection des RHE. Enfin, l'incubation en présence de l'inhibiteur PD169316, spécifiquement dirigé contre l'activité enzymatique de la MAPK p38, impacte négativement la croissance de *T. rubrum* sur gélose de Sabouraud et retarde le développement de l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum*.

En conclusion, l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* provoque une perte de l'intégrité de la barrière épidermique ainsi qu'une activation des kératinocytes qui surviennent simultanément au quatrième jour après l'infection, évoquant l'éventualité d'une relation de cause à effet entre ces deux événements. De plus, nos observations suggèrent une implication de l'homologue fongique de la MAPK p38 au cours de la croissance des arthrospores de *T. rubrum*. Par conséquent, notre étude indique que cette protéine kinase fongique pourrait représenter une cible intéressante à considérer pour le développement éventuel d'un traitement prophylactique contre les dermatophytoses.

Full title:

***Trichophyton rubrum* infection on reconstructed human epidermis induces epidermal barrier disruption and keratinocytes responses**

Émilie Faway¹, Ludivine Cambier², Evelyne De Vuyst¹, Bernard Mignon², Marc Thiry³, Yves Poumay¹ and Catherine Lambert de Rouvroit¹

¹ URPHYM-NARILIS, University of Namur, Namur, Belgium

² FARAH, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

³ Cell and Tissue biology unit, GIGA-Neurosciences, University of Liège, Liège, Belgium

Correspondence: Professor Yves Poumay, Cell and Tissue Laboratory, URPHYM-NARILIS, University of Namur, 61, rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium.

E-mail: yves.poumay@unamur.be Phone: +32 81 72 42 57 Fax: +32 81 72 42 61

Abbreviations used

- AMP: Antimicrobial peptide
- CFU: Colony-forming unit
- cldn-1: claudin-1
- LY: Lucifer Yellow
- RHE: Reconstructed human epidermis
- SC: *Stratum corneum*
- SEM: Scanning electron microscopy
- TEER: Trans-epithelial electrical resistance
- TEM: Transmission electron microscopy
- TJ: Tight junction

Abstract

Dermatophytosis is a superficial fungal infection of keratinized structures. Its prevalence is estimated between 20 and 25% in the global human population and is increasing since the last decade. Despite such threatening incidence, precise information is still lacking about possible consequences of dermatophyte infection onto epidermal barrier functions and about keratinocyte responses devoted to alert immune components and fight against infection. In order to gain knowledge about these mechanisms, we used an *in vitro* infection model of reconstructed human epidermis (RHE) by arthroconidia of the anthropophilic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Integrity of the epidermal barrier was monitored using measurement of trans-epithelial electrical resistance or of dye-permeation through the RHE. Expression and release of pro-inflammatory cytokines and antimicrobial peptides (AMP) by keratinocytes were respectively assessed by RT-qPCR on RNA from tissue extracts and by ELISA on culture media. Our results showed that *T. rubrum* infection of RHE induces simultaneous epidermal barrier disruption, including loss of functional tight junction, and pro-inflammatory cytokines and AMP expression and release by keratinocytes. In addition, by assessing the impact of p38 MAPK inhibition on these changes, we highlighted a potential role for a fungal p38 protein kinase homolog in arthroconidia growth.

Introduction

Fungal infections in humans become a growing threat for several reasons, including widespread occurrence of this type of pathogens in common living environment, problematic diagnosis due to difficulties of very variable clinical forms interpretation, and side-effects generated by antifungal treatments (Blanco et al., 2008). In addition, prevalence of fungal diseases is intended to increase with global warming (Garcia-Solache et al., 2010). Therefore, a deep insight into mechanisms involved in the pathogenicity of certain species and into components of the host defense system is crucially needed.

Dermatophytosis is a superficial infection of keratinized integument structures of the host due to various species of keratinolytic filamentous fungi, named dermatophytes. Although this is not a life-threatening disease, dermatophytosis is characterized by pain, discomfort and negative impact on self-esteem and social interactions for patients (Drake et al., 1998; Szepietowski et al., 2009). Dermatophytosis occurs in animals, as well in cattle and pets as in humans, and has become of particular interest since it must be considered as one of the most important zoonosis in Europe (Blanco et al., 2008). Worldwide in humans, dermatophytosis is responsible for 3 to 4% of dermatological consultations and is currently the most common mycosis, with an estimated prevalence between 20 and 25% in global population (Seebacher et al., 2008; Zhan et al., 2017). Furthermore, this prevalence rises, mainly resulting from increased frequency of sport practice, from increase of immigration and travels, from aging of humans and from elevated incidence of diabetes mellitus and vascular diseases (Havlickova et al., 2008; Hayette et al., 2015). Among several pathogenic species, the anthropophilic *T. rubrum* dermatophyte is responsible for a majority of human lesions (Tomoyuki et al., 2014; Lee et al., 2015). *In vivo*, infection of human glabrous skin by dermatophytes is generally limited to the *stratum corneum* (SC) (Weitzman et al., 1995), except in immunocompromised

patients where fungal elements can disseminate in deeper tissues, reaching vital organs and eventually leading to death (Squeo et al., 1998; Cheng et al., 2014). The epidermal barrier and the activation of the immune system are thought to confine invasion of dermatophytes in superficial layers of the skin. However, possible consequences of infection onto epidermal barrier functions remain poorly understood, as are responses of keratinocytes dedicated to alert innate immune components in order to fight against these potentially invading pathogens.

The epidermal barrier benefits from several components which act in synergy in order to protect the organism against external aggressions but also against water loss (Bäsler et al., 2016). SC and the tight junctions (TJ) are the physical components of the epidermal barrier. SC is composed of corneocytes which consisted in dead keratinocytes filled with keratin aggregates and lined by the cornified envelope made of densely cross-linked proteins, such as filaggrin, loricrine and involucrine. Corneocytes are maintained together by corneodesmosomes and intercellular spaces filled with lipids. This organization confers to SC an extreme resistance to physical stress and a relative impermeability to water and other chemicals (Hafttek 2015; van Smeden et al., 2016). TJ are cell-cell junctions established between keratinocytes of the granular layer and consist of occludin and claudins (cln) in the membrane and plaque proteins connected with actin filaments. TJ are responsible for the impermeability of the epidermis by controlling the paracellular pathway of small and large molecules (Kirschner et al., 2013). Moreover, TJ proteins are also involved in other cellular processes such as differentiation, proliferation, cell polarity and signal transduction (Kirschner et al., 2012). Along with the physical barrier, the chemical barrier including antimicrobial peptides (AMP) such as β -defensins, the immunological barrier and the microbiome participate altogether to the barrier function of the epidermis and can interact with each other (Proksch et al., 2008; Brandner 2016).

In case of infection, the keratinocytes are the first cells to be encountered by dermatophytes. Keratinocytes can detect pathogens via the recognition of PAMP (pathogen-associated molecular pattern) by PRR (pattern recognition receptor), notably TLR2, 4 and 6 which seem involved in dermatophytes recognition (Garcia-Madrid et al., 2011; Brasch et al., 2014; Cambier et al., 2016). Activation of PRR induces expression and release by keratinocytes of pro-inflammatory cytokines. Several *in vitro* studies performed on human keratinocytes monolayers showed increased expression and release of various cytokines, such as TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, etc., in response to stimulation by dermatophytes (Nakamura et al., 2002; Shiraki et al., 2006; Tani et al., 2007). However, the cytokines detected were very variable depending on the species of dermatophytes, zoophilic species inducing generally more inflammatory lesions than anthropophilic ones. In addition, in monolayer cultures, fungal elements were added to living keratinocytes, being poorly representative of *in vivo* infection. *In vivo* models of dermatophytosis using mouse (Cambier et al., 2014) or guinea pig (Baldo et al. 2010) exist but do not faithfully mimic the human immune responses. Furthermore, the anthropophilic species *T. rubrum*, responsible for the majority of human dermatophytosis, cannot be used in any animal model so far. Therefore, cultured skin equivalents appear the more relevant model to mimic human *T. rubrum* dermatophytosis.

An *in vitro* model of dermatophytosis through infection of reconstructed human epidermis (RHE) by arthroconidia of the anthropophilic *T. rubrum* species have been developed (Faway et al., 2017). This model appears representative of *in vivo* human dermatophytosis, with fungal elements proliferating over time, as demonstrated by histological analysis and PCR quantification, to invade the SC without penetrating through the underlying layers. This model

allowed the study of adhesion kinetics of *T. rubrum* arthroconidia to RHE and proved to be a valid tool to perform efficacy test of antifungal agents (i.e. miconazole). Two other infection models involving *T. rubrum* dermatophytes on living skin equivalents have been reported (Achtermann et al., 2015; Liang et al., 2016). Both models used conidia as infecting fungal elements conversely to our model using arthroconidia. Conidia are produced by anthropophilic dermatophytes exclusively in culture and have never been observed in skin lesions *in vivo* (Rashid 2001). The use of arthroconidia should be more representative of *in vivo* infecting spores.

Herein, we used an *in vitro* infection model of RHE by arthroconidia of *T. rubrum* (Faway et al., 2017) in order to assess damage to the epidermal barrier, as well as specific responses of keratinocytes during dermatophytosis infection. For this purpose, epidermal barrier integrity assays, electron microscopy and analysis of pro-inflammatory cytokines and AMP expression and release were performed.

Results

Epidermal barrier integrity is altered during *T. rubrum* infection

Epidermal barrier integrity of RHE was assessed during *T. rubrum* infection by measurement of trans-epithelial electrical resistance (TEER) and permeability to Lucifer Yellow (LY) fluorescent dye, whose values were considered as 100% before infection. TEER measured through non-infected control RHE and PBS-treated RHE (i.e. RHE covered by a volume of PBS identical to the one of the arthroconidia suspension and undergoing PBS washes, as infected RHE, in order to mimic a brief and transient loss of the air-liquid interface) increased over the time of tissue culture while TEER measured through infected RHE fell down to 11.5% on the fourth day after infection (**figure 1a**). Accordingly, LY permeability decreased over time in the control and PBS-treated RHE, but increased up to 335% in infected RHE on the same day (**figure 1b**). This functional alteration of the barrier in infected tissues was confirmed by their morphological analysis which revealed deeper penetration of LY fluorescence through infected RHE (**figure 1c**).

Since the measurement of TEER and LY permeability reflects functionality of the epidermal physical barrier as a whole, the integrity of TJ component of the barrier was specifically assessed by an inside-out permeability assay using biotin added in culture media of RHE on the fourth day after infection by *T. rubrum* arthroconidia (**figure 1d**). Whereas progression of biotin was stopped in the upper *stratum granulosum* of control and PBS-treated RHE, biotin signal was strong in the SC of infected RHE, suggesting reduced efficiency of TJ in such conditions. Moreover, immunostaining exhibited altered distribution of the TJ protein cln-1 during infection (**figure 1e**). Indeed, while cln-1 immunoreactivity was initially restricted to cell periphery, it was found as a diffuse signal in keratinocytes cytoplasm, in areas harboring a high number of fungal elements, on the fourth day after infection.

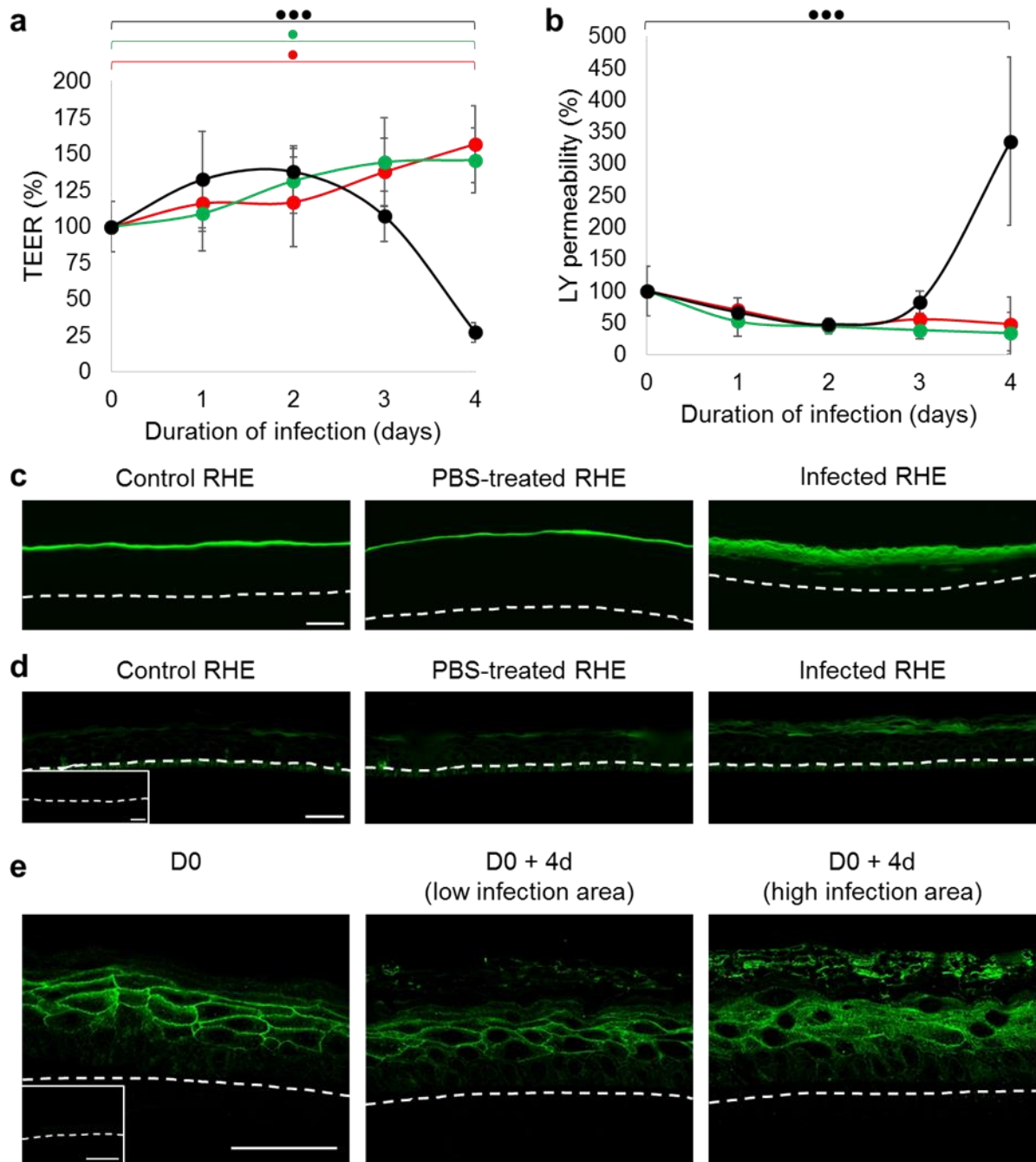


Figure 1. Alteration of epidermal barrier during infection of RHE by *T. rubrum* arthroconidia. (a) Trans-epithelial electrical resistance and (b) permeability to LY fluorescent dye of infected RHE (black) compared with control RHE (red) and PBS-treated RHE (green) (n=6; mean \pm SD; *p<0.05 ***p<0.001; ANOVA1). (c) Fluorescence analysis of LY dye penetration on the fourth day after infection. (d) Immunofluorescence localization of biotin after inside-out permeability assay on the fourth day following infection. Inset: negative control without biotin. (e) Immunofluorescence localization of cldn-1 before infection (D0) and on the fourth day following infection (D0 + 4d), in representative low or high infection area. Note a cross-reaction between cldn-1 antibody and *T. rubrum* arthrospores. Inset: control without primary antibody. Dotted lines show the filter. Scale bars: 50 μ m.

Fungal hyphae invade the SC by progressing between corneocytes

SC colonization and invasion of RHE by *T. rubrum* arthroconidia were assessed by scanning electron microscopy (SEM) (**figure 2a**) and transmission electron microscopy (TEM) (**figure 2b**) analysis. On the first day following infection, hyphae emerging from arthroconidia spread over the SC surface and penetrated the tissue by sneaking between corneocytes. On the fourth day after infection, fungal hyphae were present in SC intercellular spaces over the entire thickness. Some hyphae have reached the *stratum granulosum* and seemed to push downward granular keratinocytes as they progressively invaded more basal layers.

Pro-inflammatory cytokines and antimicrobial peptides are overexpressed and released by keratinocytes during *T. rubrum* infection

Relative mRNA expression (**figure 3a** and **c**) and release in culture media (**figure 3b** and **d**) of pro-inflammatory cytokines and AMP by keratinocytes was studied during *T. rubrum* infection respectively by RT-qPCR and ELISA. Pro-inflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β , TNF α and IL-8 and AMP β -defensins -2 (hBD2) and -3 (hBD3) mRNA were overexpressed by keratinocytes of infected RHE from the third or fourth day after infection. Accordingly, release of these cytokines and AMP in the culture media was increased on the fourth day. Moreover, TSLP and protein S100A7 mRNA were overexpressed by keratinocytes respectively from the first and fourth day and release of G-CSF slightly increased on the fourth day while IL-6 and ribonuclease-7 (RNase7) were scarcely detectable in this model (**figure S1**). Conversely, cytokines and AMP expression by keratinocytes analyzed inside PBS-treated RHE or inside RHE exposed to heat-killed arthroconidia remained unaltered.

Because copy number of DEFB4 gene, encoding hBD2, have been linked to variations in basal expression levels of hBD2, affording reduced susceptibility to develop dermatophytosis in patients with high copy number (Jaradat et al., 2015), the genotype of primary cultured keratinocytes used in this study were previously characterized and revealed only between three and five copies of this gene, corresponding to low copy number (**figure S2**).

Relative mRNA expression profile of differentiation markers and TLR by keratinocytes was also assessed during *T. rubrum* infection (**figure S3**). No alteration was observed in filaggrin, involucrin, loricrin or TLR2, 5 or 6 expression while transglutaminase-1 was slightly overexpressed as soon as the first day after infection.

p38 MAPK inhibitor PD169316 hampers infection of RHE by affecting arthroconidia

Since activation of p38 MAPK was detected in RHE (**figure S4**), its role during *T. rubrum* infection was assessed by culture of infected RHE in presence of p38 MAPK specific inhibitor PD169316. On the fourth day after infection, the presence of PD169316 prevented the decrease of TEER (**figure 4a**) and the increase of LY permeability (**figure 4b-c**) induced by *T. rubrum* infection. Besides, the extent of invasion of SC by arthroconidia was greatly reduced (**figure 4d**) and overexpression of AMP and cytokines in response to infection was no longer detected in presence of PD169316 (**figure 4e**). Preliminary results suggest that inhibition of p38 MAPK induced a delay in infection development (**figure S5**).

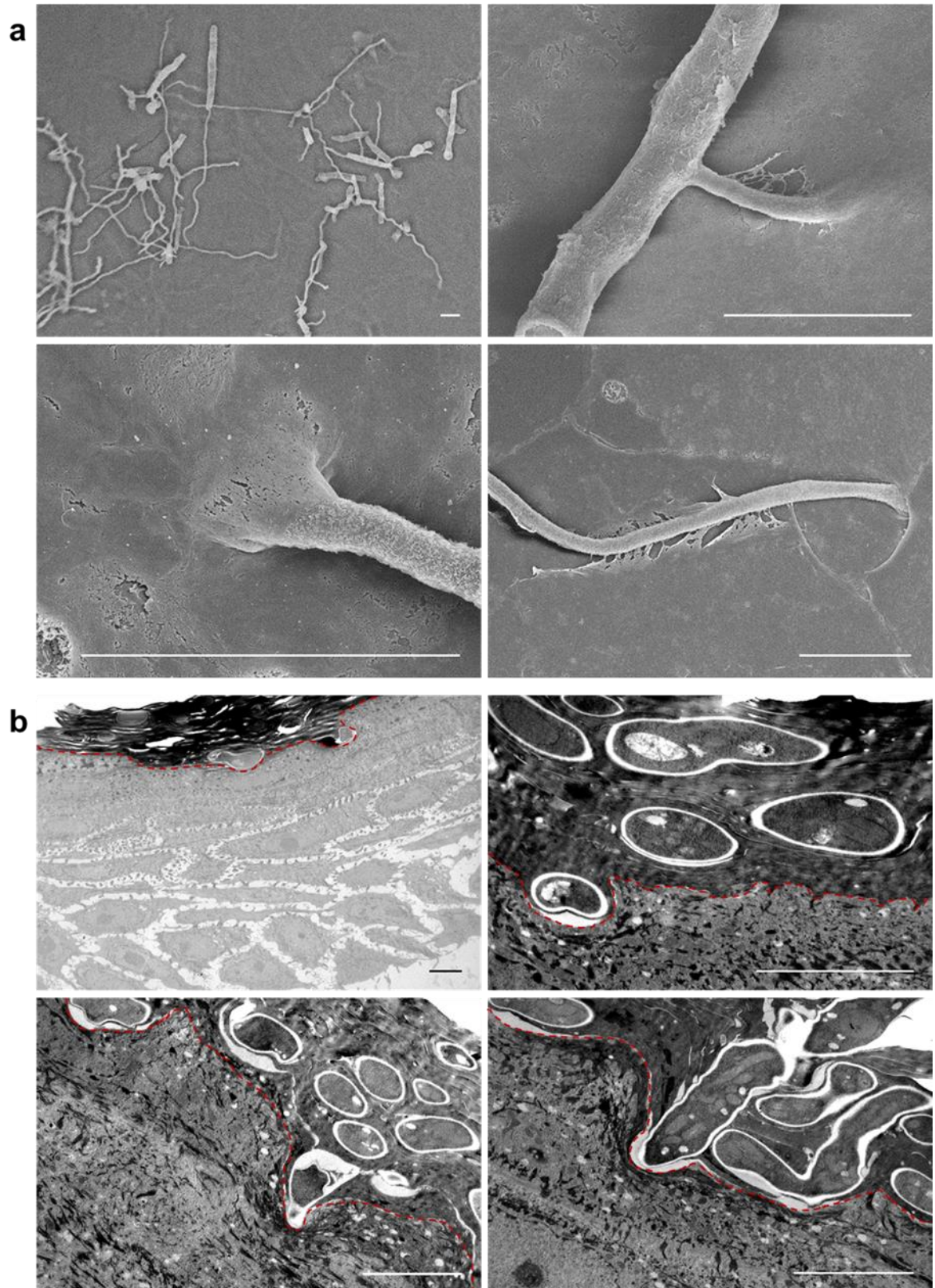


Figure 2. Fungal hyphae invade the *stratum corneum* by progressing in intercellular spaces. *Stratum corneum* colonization and invasion of RHE by *T. rubrum* arthroconidia assessed respectively **(a)** by scanning electron microscopy analysis one day after infection and **(b)** by transmission electron microscopy analysis four days after infection. Dotted lines show the limit between *stratum corneum* and *stratum granulosum*. Scale bars: 5 μ m.

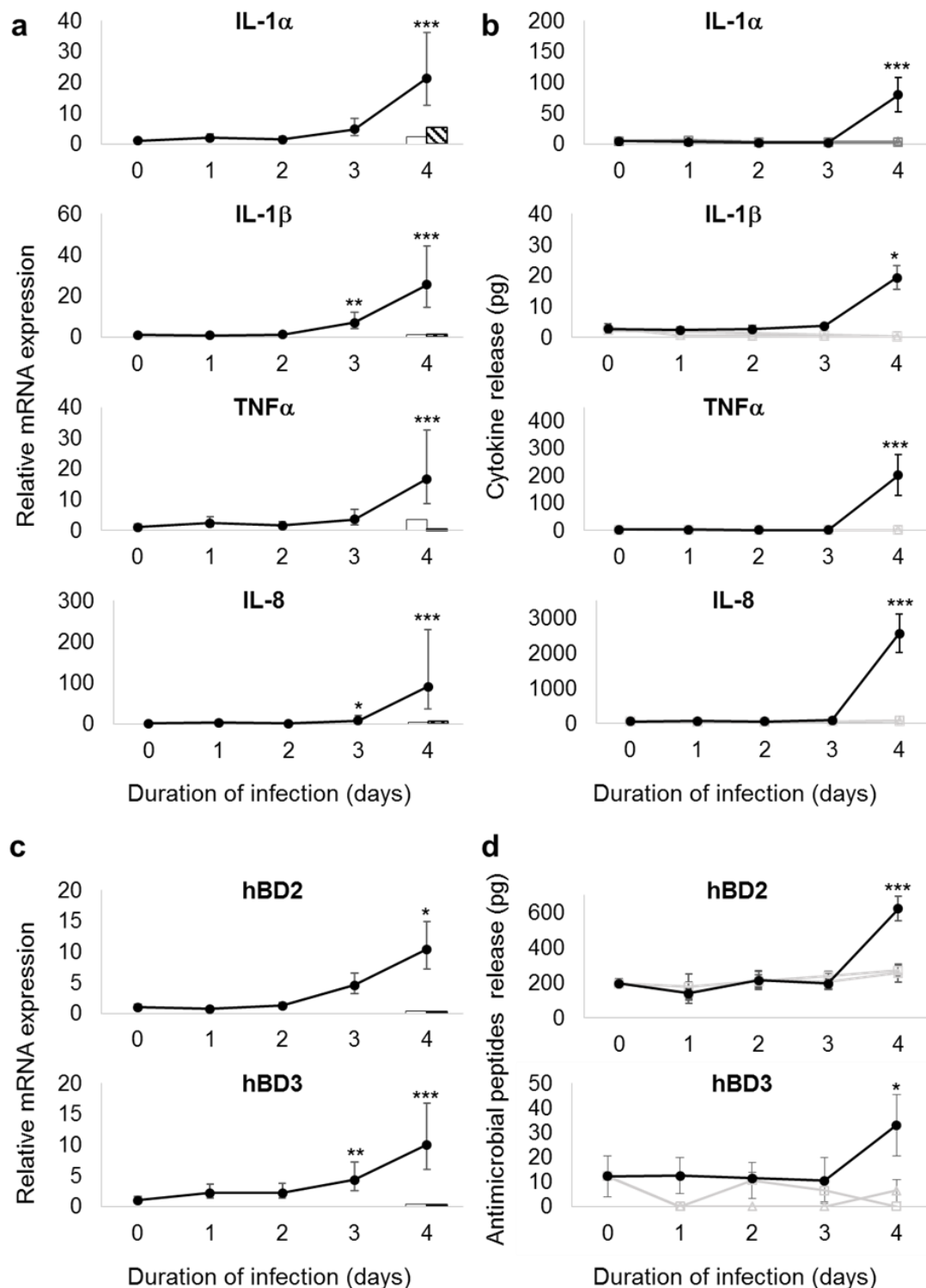


Figure 3. Pro-inflammatory cytokines and antimicrobial peptides (AMP) are expressed and released by keratinocytes four days after infection by *T. rubrum* arthroconidia. Relative mRNA expression of **(a)** pro-inflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-8) and **(c)** AMP (hBD2, hBD3) by keratinocytes of infected RHE (black dots) measured during infection by RT-qPCR. PBS-treated RHE (white column) and RHE exposed to heat-killed arthroconidia (hatched column) are used as controls (n=3; mean \pm IC95; *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 compared with D0 and controls; ANOVA1). Release of **(b)** pro-inflammatory cytokines and **(d)** AMP by infected RHE (black dots) assessed by ELISA on culture media and compared with control non-infected RHE (grey squares) and PBS-treated RHE (grey triangles) (n=3; mean \pm SD; *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 compared with D0; ANOVA1).

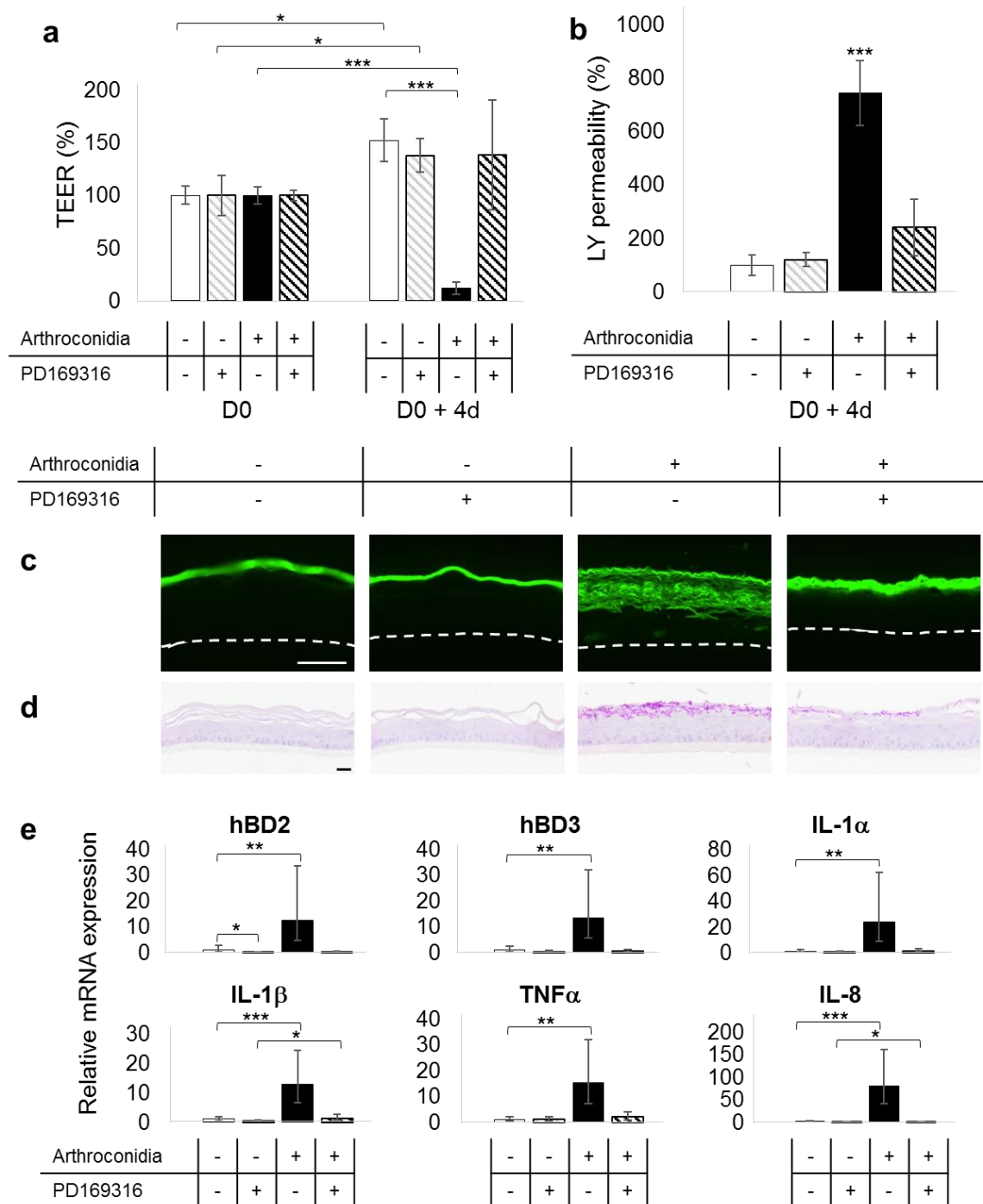


Figure 4. p38 MAPK specific inhibitor PD169316 hampers development of *T. rubrum* infection. RHE were cultured in presence of 15 μ M of PD169316 in culture medium and recovered on the fourth day following infection (D0 + 4d). **(a)** Trans-epithelial electrical resistance and **(b)** permeability to LY fluorescent dye (n=3; mean \pm SD; *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001; ANOVA1). **(c)** Fluorescence analysis of LY dye penetration. Dotted lines show the filter. Scale bar: 50 μ m. **(d)** PAS staining with α -amylase pretreatment and hemalun counterstaining of infected RHE. Scale bar: 20 μ m. **(e)** Relative mRNA expression of antimicrobial peptides (hBD2, hBD3) and cytokines (IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-8) measured by RT-qPCR (n=3; mean \pm SD; *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001; ANOVA1).

Finally, potential effect of PD169316 on *T. rubrum* growth was studied by seeding arthroconidia on Sabouraud agar containing this inhibitor. After seven days incubation at 27°C, a reduction of 32% in the number of colony-forming units (CFU) was observed in presence of PD169316 (**figure 5a**). In addition, colonies appeared smaller and more compact (**figure 5b**) and fungal hyphae seemed thinner and presented less septa, as shown by SEM analysis (**figure 5c**). In accordance, growth of *T. rubrum* arthroconidia on lyophilized RHE was impaired by PD169316 (**figure 5d**).

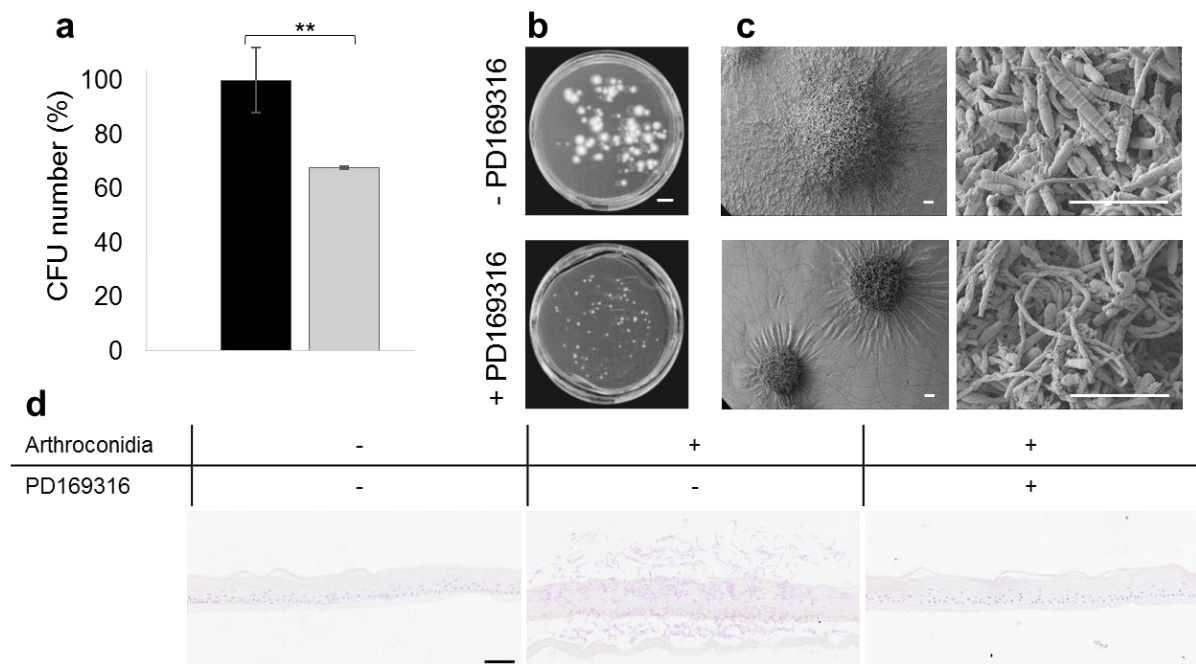


Figure 5. p38 MAPK specific inhibitor PD169316 directly impairs *T. rubrum* growth. *T. rubrum* arthroconidia were seeded on Sabouraud agar containing 15 μ M of PD169316 and incubated for seven days at 27°C. **(a)** Growth percentage of *T. rubrum* determined by colony-forming units (CFU) counting (n=3; mean \pm SD; ^{ns}p>0,05 ; *t*-Student). Aspect of colonies observed **(b)** macroscopically (Scale bar: 1 cm) and **(c)** microscopically by SEM; right panels representing a magnification of the center of colonies (Scale bars: 100 μ m). **(d)** PAS staining with α -amylase pretreatment and hemalun counterstaining of lyophilized RHE four days after their infection by *T. rubrum* arthroconidia. Scale bar: 20 μ m.

Discussion

In this study, we used an *in vitro* model of *T. rubrum* dermatophytosis on RHE to evaluate the impacts of infection on epidermal barrier integrity and to assess primary responses of keratinocytes. This model has previously been characterized and proved to be representative of *in vivo* human cutaneous dermatophytosis lesions (Faway et al., 2017).

In RHE, devoid of immune system and microbiome, the epidermal barrier consists mainly in physical components SC and TJ (Proksh et al., 2008). Epidermal barrier of control non-infected RHE strengthens over time, as demonstrated by TEER increase and LY permeability decrease, probably due to SC thickening. Epidermal barrier of PBS-treated RHE evolves following the same profile, suggesting that a transient moistening and washes do not impact

the barrier integrity. In contrast, epidermal barrier of infected RHE is disrupted on the fourth day following infection by *T. rubrum* arthroconidia, as shown by a sharp decrease of TEER and a strong increase of LY permeability. This alteration of epidermal barrier integrity during dermatophytosis infection is in accordance with a previous study showing an increase of trans-epithelial water loss in biopsy of human skin dermatophytosis lesions (Jensen et al., 2007). In addition, TJ functionality of infected RHE is lost on the fourth day after infection as demonstrated by an inside-out permeability assay using biotin. Perturbation of TJ during skin *Staphylococcus aureus* infection has already been observed *in vitro* and *in vivo* and is associated to a redistribution of TJ proteins (Ohnemus et al., 2008; Bäsler et al., 2017). In our study, immunoreactivity of TJ protein clnd-1 reveals localization of this protein in keratinocytes cytoplasm of infected RHE, while it remains clearly localized in cell membranes of control RHE, implying that a redistribution of TJ proteins may also be responsible for TJ barrier loss in response to *T. rubrum* infection. Besides, mRNA expression profile of epidermal differentiation markers is not altered during *T. rubrum* infection of RHE. However, this observation does not exclude a redistribution of these markers as it has been previously observed in biopsy of human skin dermatophytosis lesions (Jensen et al., 2007), implying that *T. rubrum* infection could also disturb the typical morphology of the epidermis.

By electron microscopy analysis, fungal elements are observed between corneocytes suggesting that *T. rubrum* hyphae invade the SC by sneaking in intercellular spaces. Interestingly, previous studies has already mentioned hyphae of *Trichophyton mentagrophytes* growing between layers of human SC without altering corneocytes, during infection of either SC sheets (Aljabre et al., 1992) or skin sections (Duek et al., 2004). It thus can be suggested that fungi are able to progressively degrade corneodesmosomes and part of the lipid extracellular matrix while hyphae penetrate the SC. This concurs with the well characterized secretion of numerous proteases (Monod et al., 2008; Sriranganadane et al., 2011) as well as of lipases and phospholipases (Mushin et al., 1997) by dermatophytes. Surprisingly, one study reported hyphae between and inside corneocytes in biopsy taken from human lesion due to *T. rubrum* dermatophytosis (Jensen et al., 2007). On the fourth day following infection of RHE, hyphae reach the granular layer and seem to push downward granular keratinocytes in order to penetrate the underlying layers. At this stage, sudden disruption of the epidermal barrier opens the door for dermatophytes to colonize the entire thickness of RHE lacking immune cells. As an evidence, histological analysis showed that fungal elements start to invade layers of living keratinocytes from the fifth day following infection leading finally to the colonization of all thickness of RHE (Faway et al., 2017). This seems in accordance with *in vivo* deeper lesions of dermatophytosis such as Majocchi's granuloma generally occurring after a physical trauma which induces a rupture of the epidermal physical barrier and passive introduction of fungal elements into the dermis (Smith et al., 1990).

Primary responses of keratinocytes were assessed during *T. rubrum* infection of RHE by measurement of pro-inflammatory cytokines and AMP expression and release. It appears that keratinocytes overexpress and subsequently release several cytokines and AMP, namely IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-8, hBD2, hBD3 and S100A7, from the third or fourth day after infection of RHE. As an exception, TSLP is overexpressed as soon as the first day following infection, possibly representing an early marker of *T. rubrum* infection. Release of growth factor G-CSF, previously depicted as an early response of epithelial cells to *Candida albicans* infection (Moyes et al., 2016), was only detected on the fourth day following infection and in low concentration. In contrast, IL-6 and RNase7 are scarcely detectable in our model. The absence of overexpression of pro-inflammatory cytokines and AMP by keratinocytes from PBS-treated

RHE and RHE exposed to heat-killed arthroconidia suggest that neither a transient loss of air-liquid interface or presence of structural fungal elements can be sufficient to induce keratinocyte responses. Several previous studies reported *in vitro* release of these cytokines by keratinocytes in response to dermatophytes while others did not detect them (Nakamura et al., 2002; Achterman et al., 2015). On another hand, overexpression and release of hBD2, hBD3, RNase7 and S100A7 in response to dermatophytes has been demonstrated *in vitro* (Firat et al., 2014) and *in vivo* (Brasch et al., 2014). Discrepancy between these results highlights differences existing in keratinocytes responses to various species of dermatophytes and the importance to characterize each interspecific interactions. Notably, different sets of cytokines are released by keratinocytes in response to anthropophilic versus zoophilic dermatophytes species (Shiraki et al., 2006; Tani et al., 2007).

Because overexpression and release of the majority of cytokines and AMP by keratinocytes, and epidermal barrier disruption of RHE occur simultaneously on the fourth day following infection by *T. rubrum* arthroconidia, we supposed that both events could be linked. A first hypothesis is that perturbation of epidermal barrier could allow intimate contact between dermatophytes and living keratinocytes able to recognize fungal patterns through TLR (Netea et al., 2008), thereby inducing production of cytokines and AMP. However, a reverse relationship cannot be excluded. As dermatophytes penetrate SC and reach proximity of granular layer, living keratinocytes could perceive their presence through recognition of fungal secreted material (Brouta et al., 2003; Descamp et al., 2003) and react by producing cytokines and AMP which can in turn influence the epidermal barrier (Kirschner et al., 2009).

Since activation of p38 MAPK is detected in RHE and has previously been associated with dermatophytosis infection (Achterman et al., 2015) and with induction of TJ barrier alteration (Kanemaru et al., 2017), we assessed its role in *T. rubrum* infection on RHE. It appears that inhibition of p38 MAPK by specific inhibitor PD169316 hampers development of *T. rubrum* infection, probably due to the direct effect of the inhibitor on arthroconidia growth. Indeed growth of arthroconidia is impaired in presence of PD169316 and colonies present abnormal morphology. This effect could be explained by the existence of a *T. rubrum* p38 protein kinase homolog presenting 50% identity with human p38 MAPK. Thus the activity of fungal p38 seems to be required for normal growth of *T. rubrum* by a still unknown pathway. This observation raises once again the need for improving our understanding about dermatophytes biology in order to design new prophylactic treatments against dermatophytosis.

In summary we have shown that *T. rubrum* infection of RHE results into simultaneous epidermal barrier disruption and pro-inflammatory cytokines and AMP expression and release by keratinocytes. In addition, we raised for the first time some evidence indicating that fungal p38 protein kinase is implied in arthroconidia growth and could represent a potential target for preventive treatment against dermatophytosis.

Materials and Methods

Dermatophyte strains and production of arthroconidia

The strain IHEM 13894 of *T. rubrum*, isolated from naturally infected human, was obtained from the Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (BCCM/IHEM collection of biomedical fungi and yeasts, Brussels, Belgium). Arthroconidia were produced as previously described (Tabart et al., 2007). Heat-killed arthroconidia were obtained by 10 minutes incubation in a boiling water bath followed by three PBS (phosphate-buffered saline) washes.

Infection of reconstructed human epidermis by *T. rubrum* dermatophyte

RHE were prepared as described (De Vuyst et al., 2014) and cultured in EpiLife medium (Cascade Biologics, Mansfield, UK) supplemented with Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS; Cascade Biologics, Mansfield, UK) and containing 1.5 mM Ca^{2+} , 10 ng/ml keratinocyte growth factor (KGF; R&D system, Abingdon, UK) and 50 µg/ml vitamin C.

The procedure used for infection was previously described (Faway et al., 2017). Concisely, RHE were infected on day 0 (D0) by topical application of a PBS-suspension of *T. rubrum* arthroconidia in order to reach a density of 1,700 arthroconidia per cm^2 . Four hours later, the suspension was removed from RHE, followed by three washes with PBS. Infected RHE were then cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 for four additional days with culture medium renewed every day.

PBS-treated RHE consisted in RHE on which only PBS was applied on D0 and which have undergone washes. For exposure of RHE to heat-killed arthroconidia, PBS was first topically applied on D0, followed four hours later by washes. RHE were then incubated four additional days. On the fourth day following PBS-exposure, 1,000,000 heat-killed *T. rubrum* arthroconidia were topically applied, this number being similar to the one of arthroconidia found alive on RHE, four days after their infection at an initial density of 1,700 per cm^2 (Faway et al., 2017). Infected RHE were finally analyzed four hours after incubation with killed arthroconidia.

Histological analysis and immunostaining

For histological analysis, RHE were processed as described (De Vuyst et al., 2014). Periodic-acid Schiff (PAS) staining was then performed with hemalun counterstaining and pretreatment with α -amylase as previously described (Faway et al., 2017).

For immunostaining of cldn-1, tissue sections were incubated in 10 mM citrate buffer pH 6 at 100°C for 20 min. After slow cooling at room temperature, sections were immersed in PBS containing 0.1 M glycine. Blocking was performed in PBS containing 0.2% bovin serum albumin (BSA) for 30 min before overnight incubation at 4°C with rabbit polyclonal anti-cldn-1 antibody (dilution 1:50 in PBS-BSA; Invitrogen, Aalst, Belgium). Sections were then incubated 45 min with goat anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488; dilution 1:1000 in PBS-BSA; Abcam, Cambridge, UK). Finally, coverslips were mounted in Mowiol and tissue sections were observed using confocal microscopy. Negative control is obtained by incubation overnight at 4°C in PBS-BSA, instead of the solution containing the primary antibody.

Assessment of epidermal barrier integrity

To measure trans-epithelial electrical resistance (TEER), EpiLife medium supplemented with HKGS was added under the RHE and over the tissue, inside the insert holding the RHE. TEER was measured using a Millicell® ERS-2 volt-ohm meter (Millipore, Overijse, Belgium). TEER values were corrected by subtracting blank values which correspond to TEER measured through an empty culture insert, and finally expressed as percentage of values determined in control RHE.

To assess permeability of RHE to fluorescent dye (Lucifer Yellow (LY) Vs dilithium salt, Sigma-Aldrich, Munich, Germany), 150 µl of LY were laid on the surface of RHE placed over 200 µl of EpiLife medium supplemented with HKGS. RHE were incubated at 37°C for 6 hours in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, protected from light. The amount of LY in the medium located under the RHE was then determined by measuring its fluorescence using a fluorescence reader. In addition, sections of RHE were observed using a fluorescent microscope in order to localize LY in RHE.

To investigate efficiency of the inside-out barrier, biotin diffusion from culture media to the apical surface of RHE was assessed. After three washes with PBS containing 1 mM CaCl₂, RHE were incubated in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 30 minutes at 37°C, over 500 µl of the same solution containing 2 mg/ml biotin (EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin; ThermoScientific, Rockford, IL). RHE were then washed three times with a PBS containing 1mM CaCl₂ and 100 mM glycine, fixed for 24h in 4% formaldehyde solution and finally embedded in paraffin. Tissue sections were stained with streptavidin conjugated to Alexa Fluor® 488 (dilution 1:500 in PBS-CaCl₂-BSA; Invitrogen, Aalst, Belgium). The localization of biotin was observed using a fluorescence microscope.

Scanning and transmission electron microscopy

For analysis by SEM, a suspension of *T. rubrum* arthroconidia was laid onto a microscopic slide previously coated with 0.1% poly-L-lysine hydrobromide (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), then air-dried for 1 hour. To observe *T. rubrum* CFU over Sabouraud agar, an agar surface of approximately 1 cm² was seeded. Infected RHE were analyzed after 24h of culture. All samples were fixed for 4 hours with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) at 4°C. Then, they were rinsed three times with 0.2 M sodium cacodylate buffer (pH 7.4) and dehydrated with increasing ethanol concentration (30-100%). After critical point-drying, or HMDS (Hexamethyldisilazane) drying for CFU over Sabouraud agar, and gold-coating, samples were analyzed using JSM-7500F scanning electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at 5 kV.

For observation by TEM, control and infected RHE were fixed at 4°C for 1 hour in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Sörensen's buffer (pH 7.4), rinsed three times with this buffer and post-fixed for 1 hour with 2% OsO₄ in the same buffer. After three washes in distilled water, samples were dehydrated in ascending concentration of ethanol (70-100%) and embedded in Epoxy resin. Finally, ultrathin sections obtained with a Reichert ultracut S ultramicrotome were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed using JEM-1400 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan) at 80 kV.

RT-qPCR

Total RNA was extracted from infected and control (i.e. PBS-treated RHE and RHE exposed to heat-killed arthroconidia) RHE using RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instruction. Concentration and purity of extracted RNA were determined using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Rockford, IL). Subsequently, RNA was reverse-transcribed into cDNA using the SuperScript™ III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Aalst, Belgium). The cDNA was diluted 1:20 in distilled water and stored at -20°C.

All primers used for RT-qPCR showed an efficacy between 85% and 110% and are described in **Table 1**. qPCR mixture was composed of Takyon™ ROX SYBR® Master Mix (Eurogentec, Seraing, Belgium), 300 nM of each primer and 5 µl of cDNA 1:20 in a total volume of 20 µl. The amplification protocol started by 10 min denaturation at 95°C, followed by 45 cycles of denaturation for 10 s at 95°C, annealing for 10 s at 60°C and elongation for 10 s at 72°C and was performed using Light Cycler® 96 (Roche, Basel, Switzerland). RPLP0 was used as reference gene.

Table 1: Sequence and efficacy of primer pairs used for RT-qPCR		
Gene symbol	Forward primer	Reverse Primer
RPLP0	ATCAACGGGTACAAACGAGTC	CAGATGGATCAGCCAAGAAGG
FLG	GGGCACTGAAAGGCCAAAAG	CACCATAATCATAATCTGCACTACCA
IVL	TGAAACAGCCAACTCCAC	TTCTCTTGCTTTGATGGG
TGM1	GTCGTCTCCGGCTCGAA	TCACTGTTTCATTGCCTCCAAT
LOR	TCATGATGCTACCCGAGGTTTG	CAGACCTAGATGCAGCCGGAGA
TSLP	CGCGTCGCTCGCCAAAGAAA	TGAAGCGACGCCACAATCCTTG
IL-1 α	AACCACTGCTGCTGAAGGAGAT	TGGTCTCACTACCTGTGATGGTTT
IL-1 β	TCCCCAGCCCTTTTGTTGA	TTAGAACCAATGTGGCCGTG
TNF α	GAGGCCAAGCCCTGGTATG	CGGGCCGATTGATCTCAGC
IL-8	GCAGAGGGTTGTGGAGAAGTTT	TTGGATACCACAGAGAATGAATTTTT
IL-6	CCTGAACCTTCCAAAGATGGC	TTCAACAGGCAAGTCTCCTCA
hBD-2	ATCAGCCATGAGGGTCTTGT	GAGACCACAGGTGCCAATTT
hBD-3	TCCAGGTCATGGAGGAATCAT	CGAGCACTTGCCGATCTGT
S100A7	ACGTGATGACAAGATTGAGAAGC	GCGAGGTAATTTGTGCCCTTT
RNase 7	CGTGTCCCTGACCATGTGTAA	GACTTGTTCTGTGCTTCTCTT
TLR2	ATCCTCCAATCAGGCTTCTCT	GGACAGGTCAAGGCTTTTACA
TLR5	TCCCTGAACTCACGAGTCTTT	GGTTGTCAAGTCCGTAATATGC
TLR6	TTCTCCGACGGAAATGAATTTGC	CAGCGGTAGGTCTTTTGGAAC

ELISA

ELISA were performed on culture media using commercial ELISA kits listed in **Table 2**.

Table 2: Commercial ELISA kit	
Cytokine / AMP	ELISA kit
IL-1 α	Human IL-1 alpha/IL1F1 DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
IL-1 β	Human IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
TNF α	Human TNF-alpha DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
TSLP	Human TSLP DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
IL-8	Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
IL-6	Human IL-6 DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
G-CSF	Human G-CSF DuoSet ELISA (R&D system, Abingdon, UK)
hBD-2	Human BD-2 Mini ABTS ELISA Development Kit (PeproTech, London, UK)
hBD-3	Human BD-3 Mini ABTS ELISA Development Kit (PeproTech, London, UK)

DNA extraction and absolute quantification by PCR

In order to perform precise specific quantitation of fungal cells in infected RHE, *T. rubrum* 18S rDNA copy number was determined using a previously described method, based on quantitative PCR (Faway et al., 2017).

Chemicals

PD169316 was purchased from Santa Cruz biotechnology (Heidelberg, Germany).

Statistical Analyses

All statistical analyses were carried out using SigmaPlot 11.0 software. One-way analysis of variance (ANOVA1) and *t*-Student test were performed to analyze our data.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the technical help provided by B. Balau, C. Charlier, V. De Glas, C. De Mazy, K. De Swert, Pr J. Gilloteaux and D. Van Vlaender. Special thanks are addressed to Dr B. Bienfait (Clinique St. Luc, Namur-Bouge, Belgium) for providing skin samples. EF is supported by a research fellowship (MYCAVERT, convention 1318058) from the *Région Wallonne*.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- Achterman R, Moyes D, Thavaraj S, Smith A, Blair K, White T et al. Dermatophytes activate skin keratinocytes via mitogen-activated protein kinase signaling and induce immune responses. *Infect Immun* 2015;83:1705-1714
- Aljabre S, Richardson M, Scott E, Shankland G. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum *in vitro*. *J Med Vet Mycol* 1992;30:145-152
- Baldo A, Mathy A, Tabart J, Camponova P, Vermout S, Massart L et al. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. *Br J Dermatol* 2010;162:990-997
- Bäsler K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M, Brandner J. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release* 2016;242:105-118
- Bäsler K, Galliano M-F, Bergmann S, Rohde H, Wladykowski E, Vidal-y-Sy S et al. Biphasic influence of *Staphylococcus aureus* on human epidermal tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2017;1405:53-70
- Blanco J, Garcia M. Immune response to fungal infection. *Vet Immunol Immunop* 2008;125:47-70
- Brandner J. Importance of tight junctions in relation to skin barrier function. *Curr Probl Dermatol* 2016;49:27-37
- Brasch J, Mörig A, Neumann B, Proksch E. Expression of antimicrobial peptides and toll-like receptors is increased in *tinea* and *pityriasis versicolor*. *Mycoses* 2014;57:147-152
- Brouta F, Descamp F, Vermout S, et al. Humoral and cellular immune response to a *Microsporum canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pig. *Med Mycol*. 2003; 41; 495-502
- Cambier L, Weatherspoon A, Defaweux V, Bagut E, Heinen M, Antoine N et al. Assessment of the cutaneous response during *Arthroderma benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* infection using an experimental mouse model. *Br J Dermatol* 2014;170:625-633
- Cambier L, Heinen M, Bagut E, Antoine N, Mignon B. Overexpression of TLR-2 and TLR-4 mRNA in feline polymorphonuclear neutrophils exposed to *Microsporum canis*. *Vet Dermatol* 2016;27:78-e22
- Cheng C, Hsiao Y, Ko. J. Disseminated deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*. *Dermatol Sin* 2014;32:191-192
- De Vuyst E, Charlier C, Giltair S, De Glas V, Lambert de Rouvroit C, Poumay Y. Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter. *Methods Mol Biol*.2014;1195:191-201
- Descamp F, Brouta F, Vermout S, Monod M, Losson B, Mignon B. Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:29-34
- Drake L, Scher R, Smith E, Faich G, Smith S, Hong J et al. Effect of onychomycosis on quality of life. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:702-704
- Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I. The pathogenesis of dermatophyte infection in human skin sections. *J Infect*. 2004;48:175-180
- Faway E, Cambier L, Mignon B, Poumay Y, Lambert de Rouvroit C. Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: A new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents. *Med Mycol* 2017;55:485-494

- Firat Y, Simanski M, Rademacher F, Schröder L, Brasch J, Harder J. Infection of keratinocytes with *Trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3. PLoS ONE 2014;9:e93941
- Garcia-Madrid L, Huizar-Lopez M, Flores-Romo L, Islas-Rodriguez A. *Trichophyton rubrum* manipulates the innate immune functions of human keratinocytes. Cent Eur J Biol 2011;6:902-910
- Garcia-Solache M, Casadevall A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. MBio 2010;1:e00061-10
- Hafttek M. Epidermal barrier disorders and corneodesmosome defects. Cell Tissue Res 2015;360:483-490
- Havlickova B, Czaika V, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses 2008;51:2-15
- Hayette M, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. Curr Fungal Infect Rep 2015;9:164-179
- Jaradat S, Cubillos S, Krieg N, Lehmann K, Issa B, Piehler S et al. Low DEFB4 copy number and high systemic hBD-2 and IL-22 levels are associated with dermatophytosis. J Invest Dermatol 2015;135:750-758
- Jensen J, Pfeiffer S, Akaki T, Schröder J, Kleine M, Neumann C et al. Barrier function, epidermal differentiation, and human β -defensin 2 expression in *tinea corporis*. J Invest Dermatol 2007;127:1720-1727
- Kanemaru K, Nakamura Y, Totoki K, Fukuyama T, Shoji M, Kaneko H et al. Phospholipase C δ 1 regulates p38 MAPK activity and skin barrier integrity. Cell Death Differ 2017;24:1079-1090
- Kirschner N, Poetzel C, von den Drieschn P, Wladykowski E, Moll I, Behne M et al. Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. Am J Pathol 2009;175:1095-1106
- Kirschner N, Brandner J. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. Ann N Y Acad Sci 2012;1257:158-166
- Kirschner N, Rosenthal R, Furuse M, Moll I, Fromm M, Brandner J. Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. J Invest Dermatol 2013;133:1161-1169
- Lee W, Kim S, Jang Y, Lee S, Kim D, Bang Y et al. Increasing prevalence of *Trichophyton rubrum* identified through an analysis of 115,846 cases over the last 37 years. JKMS 2015;30:639-643
- Liang P, Huang X, Yi J, Chen Z, Ma H, Ye C et al. A *Trichophyton rubrum* infection model based on the reconstructed human epidermis – Episkin. Chinese Med J 2016;129:54-58
- Monod M. Secreted proteases from dermatophytes. Mycopathologia 2008;166:285-294
- Moyes D, Wilson D, Richardson J, Mogavero S, Tang S, Wernecke J et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. Nature 2016;532:64-85
- Mushin T, Aubaid A, Al-Duboon A. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. Mycoses 1997;40:465-469
- Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Watanabe S. Interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. Clin Diagn Lab Immunol 2002;9:935-937
- Netea M, Brown G, Kullberg B, Gow N. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. Nat Rev Microbiol 2008;6:67-78

Ohnemus U, Kohrmeyer K, Houdek P, Rohde H, Wladykowski E, Vidal-y-Sy S et al. Regulation of epidermal tight-junction (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative *Staphylococcus* strains. *J Invest Dermatol* 2008;128:906-916

Proksch E, Brandner J, Jensen J. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008;17:1063-1072

Rashid A. Arthroconidia as vectors of dermatophytosis. *Cutis* 2001;67:23

Seebacher C, Bouchara J-P, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 2008;166:335-352

Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol* 2006;55:1175-1185

Smith K J, Neafit R C, Skelton H G, Barret T L, Graham J H, Lupton G P. Majocchi's granuloma. *Cutan Pathol* 1990;18:28-32

Squeo R, Beer R, Silvers D, Weitzman I, Grossman M. Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. *J Am Acad Dermatol* 1998;39:379-380

Sriranganadane D, Waridel P, Salamin K, Feuermann M, Mignon B, Staib P et al. Identification of novel secreted proteases during extracellular proteolysis by dermatophytes at acidic pH. *Proteomics* 2011;11:4422-4433

Szepietowski J, Reich A. Stigmatisation in onychomycosis patients: a population-based study. *Mycoses* 2009;52:343-349

Tabart J, Baldo A, Vermout S, Nusgens B, Lapiere C, Losson B et al. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporum canis* dermatophytosis. *J Med Microbiol* 2007;56:971-975

Tani K, Adachi M, Nakamura Y, Kano R, Makimura K, Hasegawa A et al. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2007;299:381-387

Tomoyuki I, Kazushi A, Takashi M. Quantification of dermatophyte viability for evaluation of antifungal effect by quantitative PCR. *Mycopathologia* 2014;177:241-249

Van Smeden J, Bouwstra J. *Stratum corneum* lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Curr Probl Dermatol* 2016;49:8-26

Weitzman I, Summerbell R. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:240-259

Zhan P, Liu W. The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia* 2017;182:77-86

1. Supplementary material

Protein extraction and Western blotting

Proteins were extracted from RHE by 5 minutes incubation in twice concentrated Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 8.7% glycerol, 0.05% bromophenol blue, 0.2% dithiothreitol) in a boiling water bath. Then, proteins were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (ThermoScientific, Rockford, IL). Blocking of the membrane in PBS containing 1% Tween 20 and 5% powdered milk was followed by overnight incubation at 4°C with primary antibody. After washes, the membrane was incubated for one hour at room temperature with HRP (horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibody before chemiluminescent detection performed by using BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The detection of RPL13a protein was used as a loading control. Primary antibodies used for Western blotting are described in **Table S1**.

Table S1: Primary antibodies used for Western Blotting

Protein	Species	Company	Dilution
RPL13a	Rabbit	Cell Signaling TECHNOLOGY®, Leiden, Netherlands	1/1000
p38 MAPK	Rabbit	Cell Signaling TECHNOLOGY®, Leiden, Netherlands	1/1000
Phospho-p38 MAPK	Rabbit	Cell Signaling TECHNOLOGY®, Leiden, Netherlands	1/1000

2. Supplementary results

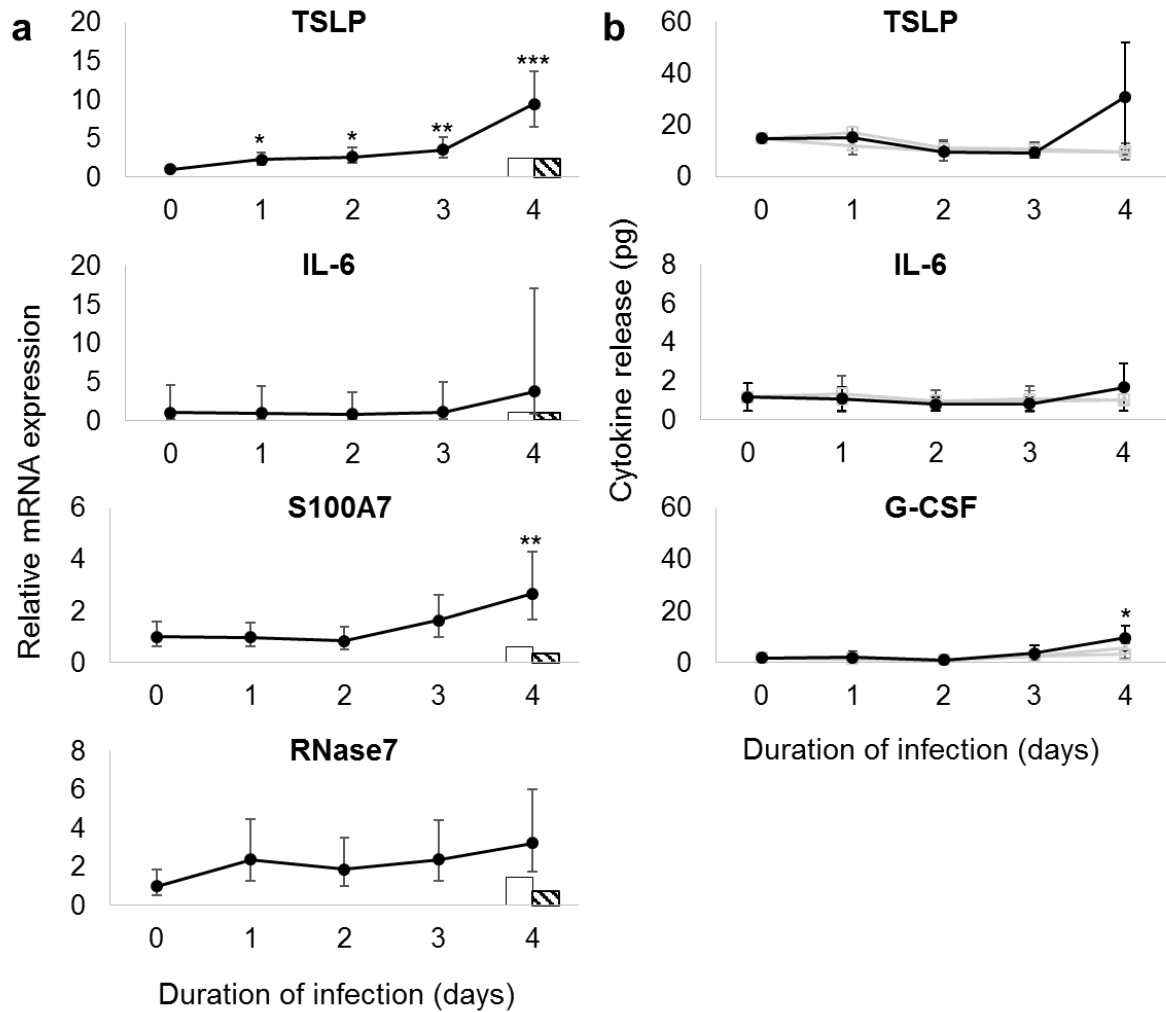


Figure S1. TSLP and antimicrobial peptide S100A7 are overexpressed by keratinocytes during *T. rubrum* infection. (a) Relative mRNA expression of pro-inflammatory cytokines (TSLP, IL-6) and antimicrobial peptides (S100A7, RNase7) by keratinocytes of infected RHE (black dots), of PBS-treated RHE (white column) and of RHE exposed to heat-killed arthroconidia (hatched column), measured during infection by RT-qPCR (n=3; mean \pm IC95; *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 compared with D0; ANOVA1). (b) Release of pro-inflammatory cytokines (TSLP, IL-6, G-CSF) by infected RHE (black dots) assessed by ELISA on culture media and compared with control RHE (grey squares) and PBS-treated RHE (grey triangles) (n=3; mean \pm SD; *p<0.05 compared with D0; ANOVA1).

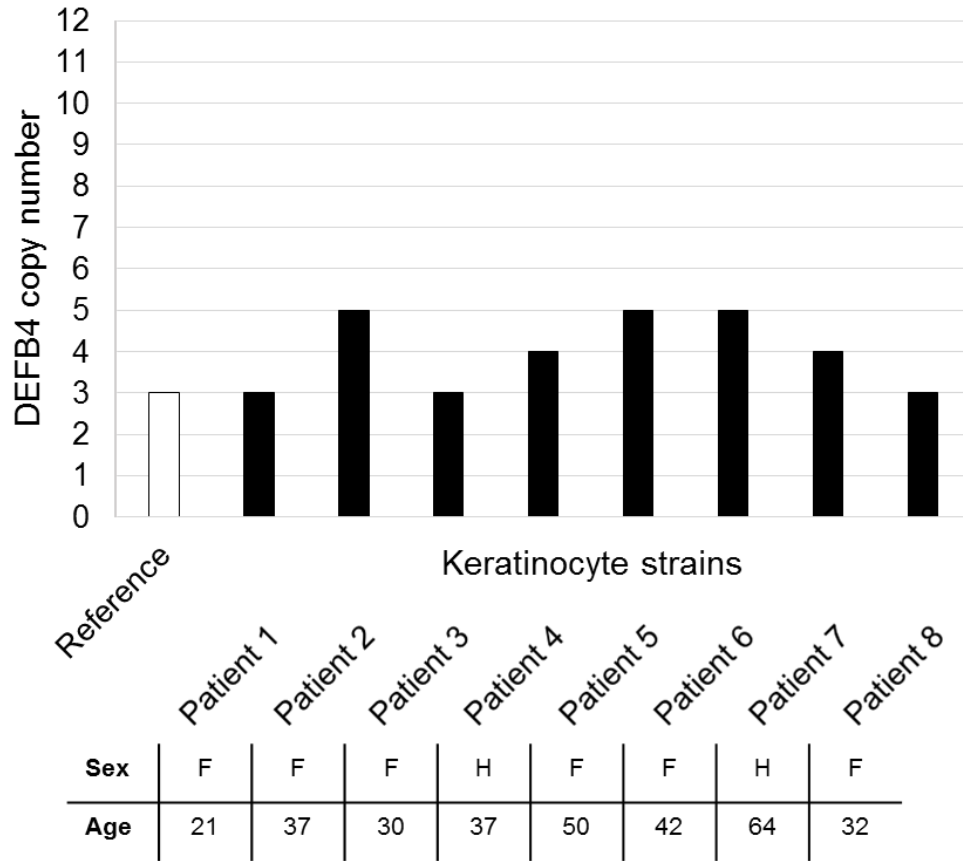


Figure S2. Copy number of DEFB4 gene, encoding antimicrobial peptide hBD2, in primary keratinocytes strains used to produce reconstructed human epidermis. DEFB4 gene copy number was assessed in primary keratinocytes isolated from different patients. Genomic DNA was extracted from keratinocytes using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen cat. no. 69504) according to the manufacturer instructions. Genomic DNA was then subjected to a qPCR amplification using the TaqMan® Copy Number Assays (Applied Biosystems, Lennik, Belgium) and copy number of DEFB4 gene was determined in relation to a reference DNA with known copy number of DEFB4 gene (DNA C0913, Culture Collections from Public Health England, UK).

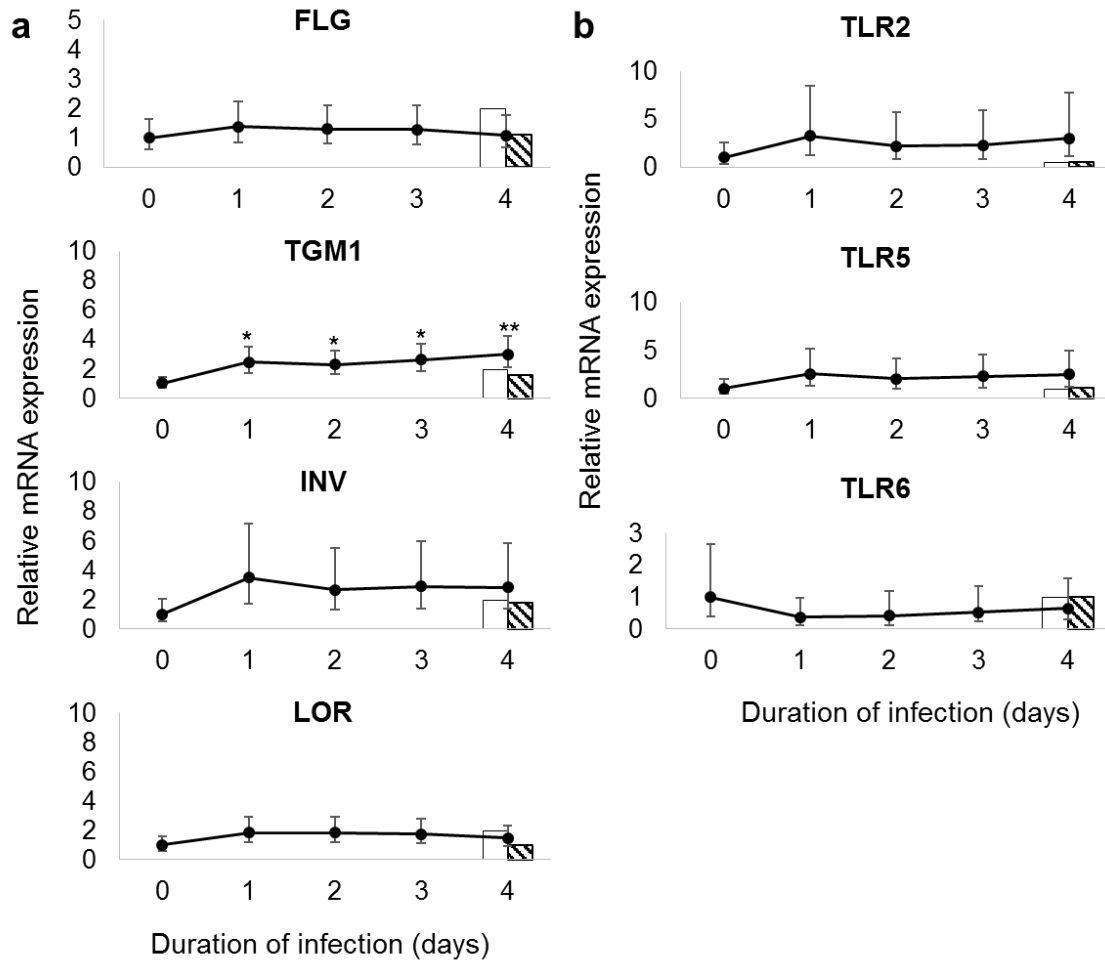


Figure S3. Transglutaminase-1 is overexpressed by keratinocytes during *T. rubrum* infection. Relative mRNA expression of (a) differentiation markers, filaggrin (FLG), involucrin (IVL), loricrin (LOR) and transglutaminase-1 (TGM1), and (b) TLR2, 5 and 6 in infected RHE (black dots). PBS-treated RHE (white column) and RHE exposed to heat-killed *T. rubrum* arthroconidia (hatched column) were used as controls (n=3; mean \pm IC95; *p<0.05 **p<0.01 compared with D0; ANOVA1).

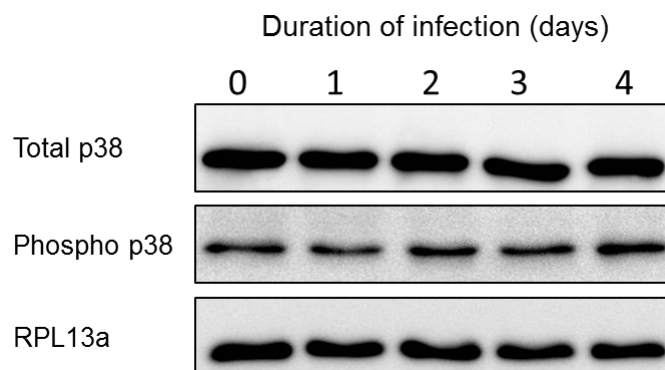


Figure S4. p38 MAPK is phosphorylated in RHE. Protein level of total p38 MAPK and phosphorylated p38 MAPK was assessed during infection by Western blotting after protein extraction from RHE. The detection of RPL13a protein was used as loading control (representative result from three independent experiments).

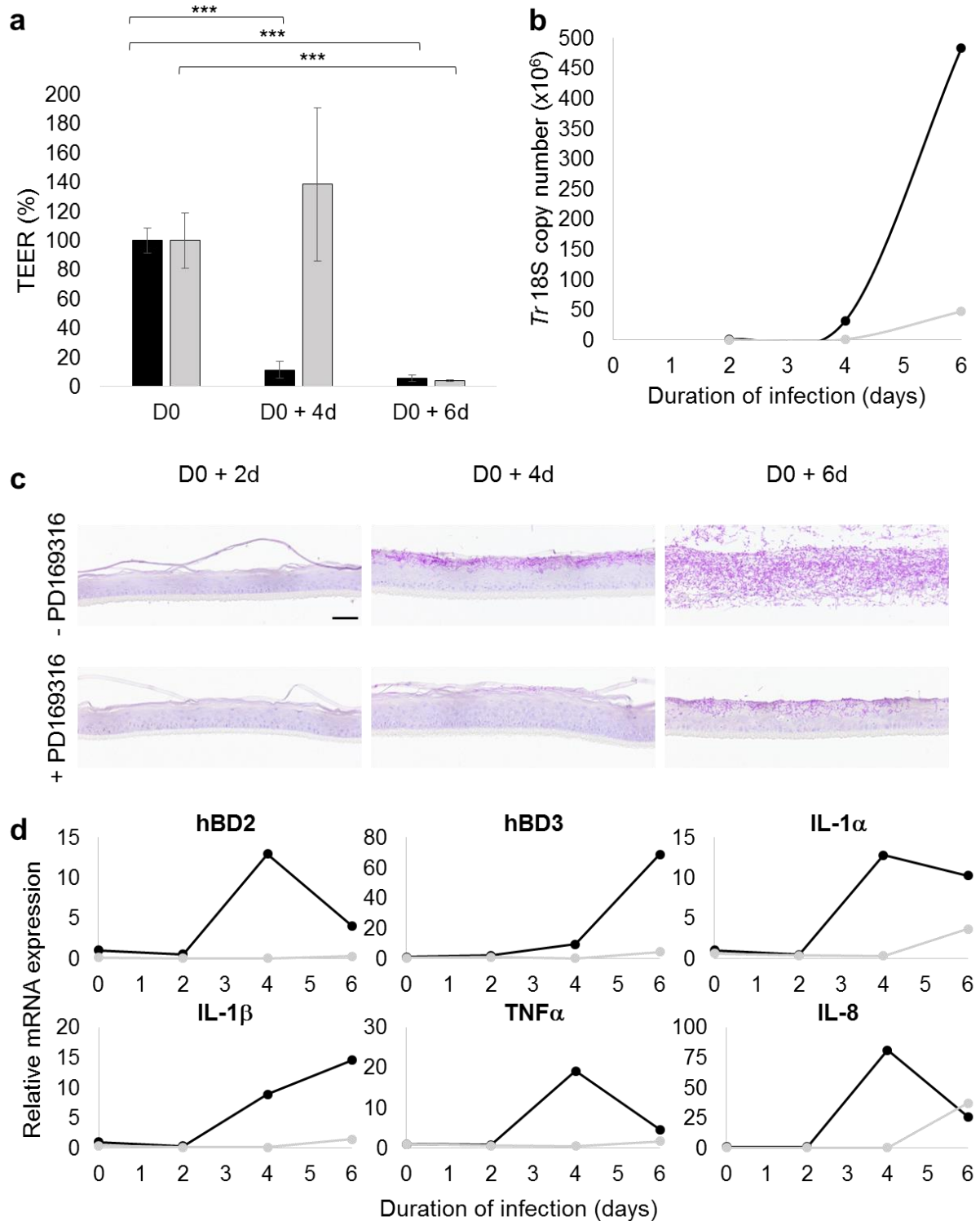


Figure S5. p38 MAPK specific inhibitor PD169316 slows down the infection of RHE. RHE were cultured in presence (grey) or not (black) of 15 μ M of PD169316 and recovered two (D0 + 2d), four (D0 + 4d) or six (D0 + 6d) days after infection. **(a)** Trans-epithelial electrical resistance (n=3; mean \pm SD; *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001; ANOVA1). **(b)** Analysis of *T. rubrum* 18S rDNA copy number by qPCR (n=1). **(c)** PAS staining with α -amylase pretreatment and hemalun counterstaining. Scale bar: 20 μ m. **(d)** Relative mRNA expression of antimicrobial peptides (hBD2, hBD3) and cytokines (IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-8) (n=1).

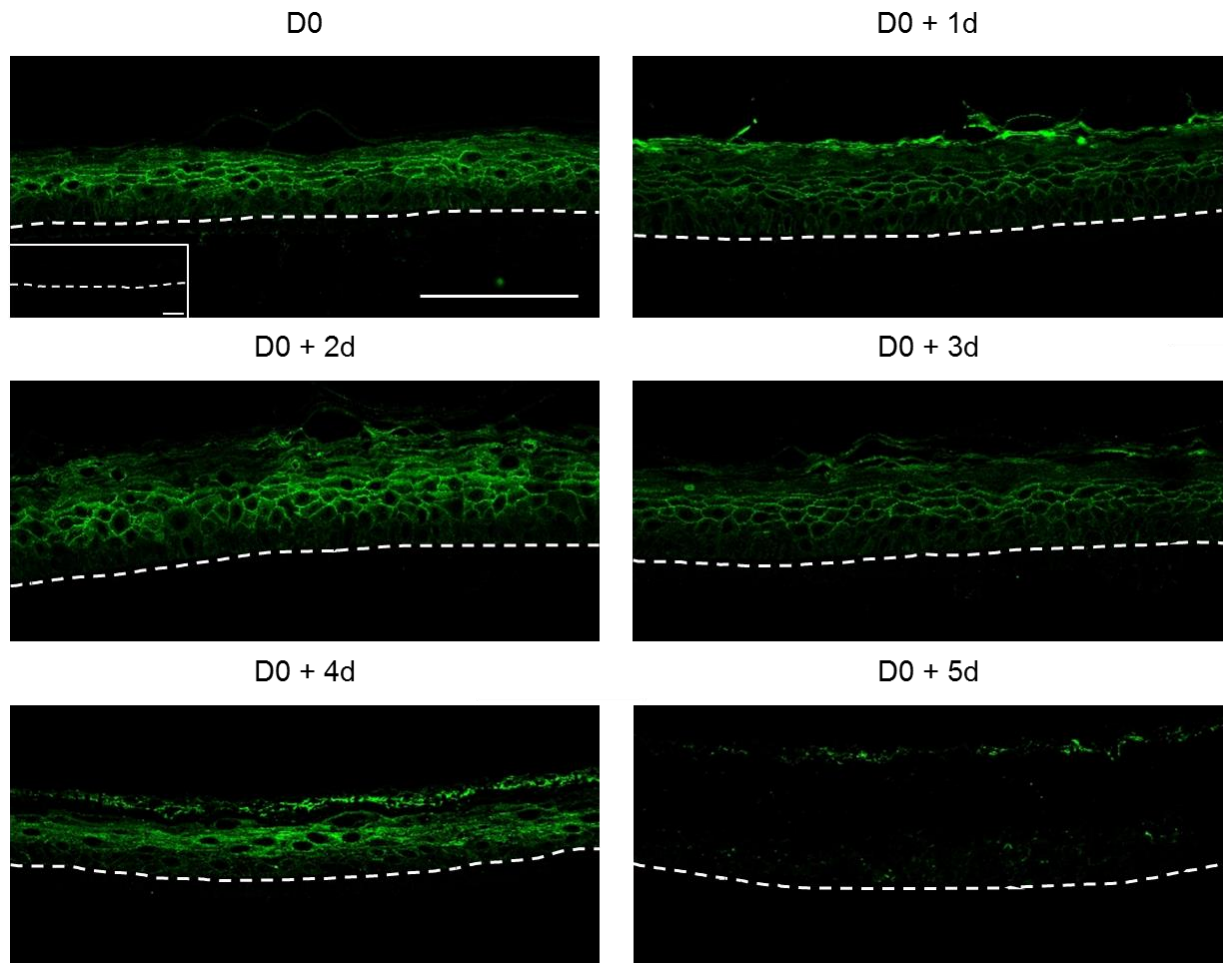


Figure S6. Localization of claudin-1 in infected RHE is perturbed during *T. rubrum* infection. Immunofluorescence localization of cln-1 in RHE was assessed before infection (D0) and during five days following infection. Inset: control without primary antibody. Dotted lines show the filter. Scale bar: 100 μm .

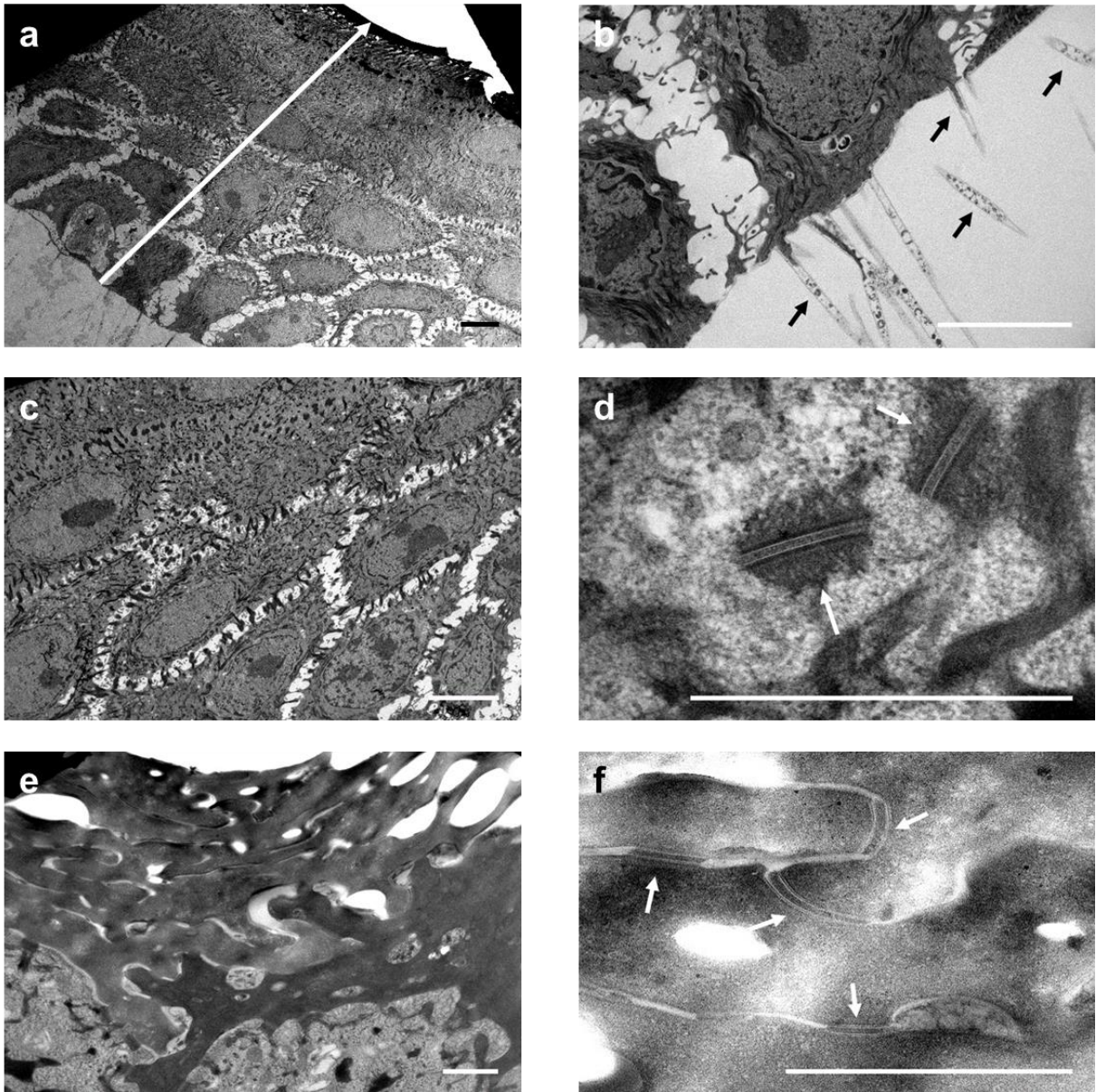


Figure S7. Transmission electron microscopy analysis of reconstructed human epidermis (RHE) reveals a structural organization similar to *in vivo* epidermis. Morphology of RHE was assessed on the eleventh day of reconstruction by transmission electron microscopy and allowed to observe **(a)** total thickness of RHE from polycarbonate filter to *stratum corneum* (arrow direction), **(b)** cellular protrusions inserted in pores of polycarbonate filter (arrows), **(c)** spinous layer characterized by **(d)** desmosomes (arrows) and **(e)** cornified layer with **(f)** corneodesmosomes (arrows). Scale bars: 5 μ m.

DISCUSSION

La recherche qui a mené à cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un projet intitulé MycAvert, financé par le programme WB Health 2013, et ayant pour but le développement d'un produit utilisable pour la prévention des dermatophytoses chez l'homme. Le développement d'un tel produit nécessite préalablement une compréhension approfondie de la pathogénie de ce type d'infection. L'objectif de cette thèse a donc été de contribuer à l'amélioration des connaissances et des outils d'investigation actuels, relatifs aux interactions existant entre les dermatophytes et les cellules hôtes et qui conduisent au développement d'une infection, puis au déclenchement d'une réponse immunitaire efficace.

1. Modèle de dermatophytose sur épiderme humain reconstruit

La première partie de ce travail a consisté en la mise au point d'un modèle de dermatophytose par infection d'épiderme humain reconstruit (RHE) (Faway 2017). Les équivalents épidermiques humains, parce qu'ils subissent le processus de kératinisation et grâce à leur disponibilité et leur reproductibilité, représentent actuellement le meilleur modèle d'étude expérimentale de la physiologie normale ou pathologique de l'épiderme humain. Les RHE développés au Laboratoire de Cellules et Tissus (URPHYM) de l'UNamur présentent une structure histologique comparable à celle de l'épiderme humain *in vivo* et reconstruisent une barrière épidermique fonctionnelle (Poumay 2004, Frankart 2012a). L'analyse par microscopie électronique à transmission a confirmé la similarité morphologique entre RHE et épiderme humain au niveau cellulaire, prenant évidemment en compte le fait que les RHE ne sont constitués que de kératinocytes.

En pratique, les RHE sont infectés par application topique des arthrospores du dermatophyte anthropophile *Trichophyton rubrum* à une densité de 1.700 par cm² directement en surface de la couche cornée, mimant le mode de contamination classique par contact. L'espèce *T. rubrum* a été choisie car il s'agit de l'espèce responsable de la majorité des dermatophytoses humaines (Lee 2015, Zhan 2017). Cependant, il a été montré que le modèle d'infection pouvait être facilement adapté pour l'étude d'autres espèces de dermatophytes, notamment les espèces zoophiles *Microsporum canis* et *Trichophyton benhamiae* (anciennement appelé *Arthroderma benhamiae*), par modulation de la densité d'arthrospores appliquées sur les RHE, respectivement de 17.000 et 53 par cm². Cette surprenante et énorme différence dans la densité des arthrospores nécessaire à l'infection des RHE reflète probablement l'existence d'une réelle variabilité dans les mécanismes d'infection mis en œuvre par les différentes espèces de dermatophytes. On peut noter par exemple que les adhésines exprimées en surface des arthrospores pour permettre leur adhérence au tissu hôte (Esquenazi 2003, Esquenazi 2004) sont caractérisées par un domaine central en répétitions en tandem dont le nombre varie entre les espèces de dermatophytes (Bitencourt 2016). Cette variation dans les séquences des adhésines est probablement à l'origine de capacités adhésives différentes. Par ailleurs, le niveau d'expression des protéases sécrétées par les dermatophytes durant l'infection varie fortement d'une espèce à l'autre (Giddey 2007). Ces protéases étant impliquées dans les mécanismes d'infection, particulièrement dans les étapes d'adhérence (Baldo 2008, Baldo 2010, Bagut 2012) et d'invasion (Monod 2008, Grumbt 2013), leur niveau d'expression variable est aussi susceptible d'expliquer en partie les variations démontrées ici dans la densité d'arthrospores de différentes espèces de dermatophytes qui est nécessaire au développement d'une infection similaire sur RHE. Contrairement à d'autres

modèles de dermatophytose sur équivalents épidermiques qui utilisent des conidies comme agents infectieux (Achterman 2015, Liang 2016), le modèle développé au cours de cette thèse utilise les arthrospores. Bien que techniquement plus complexes à produire en laboratoire, les arthrospores sont plus proches des spores infectantes *in vivo* que les conidies qui, jusqu'à présent, n'ont été observées que dans les cultures *in vitro* (Rashid 2001).

L'analyse histologique par coloration histochimique à l'acide periodique de Schiff et la quantification du taux d'infection par PCR quantitative (qPCR) montrent que les arthrospores de *T. rubrum* prolifèrent au cours du temps et produisent des hyphes qui envahissent progressivement le tissu épidermique. Quatre jours après l'infection des RHE, les éléments fongiques ont envahi la couche cornée sans pénétrer dans les couches vivantes de kératinocytes. A ce stade l'invasion des RHE est donc représentative des lésions cutanées *in vivo* dans lesquelles l'infection reste superficielle et limitée à la couche cornée (Nenoff 2014b). C'est pourquoi, pour les études d'adhérence et d'invasion du tissu, ainsi que pour l'analyse de la réponse des kératinocytes face à l'infection, la culture des RHE infectés a été systématiquement stoppée au quatrième jour suivant leur infection. En effet, lorsque les RHE infectés sont maintenus en culture plus longtemps, les éléments fongiques colonisent rapidement les couches vivantes de kératinocytes, conduisant finalement à la destruction du tissu. *In vivo*, la limitation de l'infection à la couche cornée serait due principalement au système immunitaire qui bloquerait la progression des éléments fongiques dès leur arrivée dans les couches vivantes de l'épiderme. Un élément en faveur de cette hypothèse est le développement chez les patients immunodéprimés de dermatophytoses profondes, caractérisées par la présence d'éléments fongiques dans les tissus sous-cutanés et dans les organes internes (Squeo 1998, Cheng 2014). La présence de transferrine dans le sérum pourrait également expliquer en partie la localisation superficielle des dermatophytes *in vivo* (Carlisle 1974, King 1975). Cette protéine sérique est en effet capable de lier et de séquestrer le fer minéral le rendant indisponible pour les dermatophytes. Toutefois, le milieu utilisé pour la culture des RHE infectés contient de la transferrine, ce qui suggère que cette dernière à elle seule ne permet pas de limiter la dissémination des hyphes dans les couches profondes de l'épiderme. Enfin, le sébum (Rothman 1946, Kligman 1950) et le microbiome (Sanford 2014) présents *in vivo* en surface de l'épiderme jouent aussi un rôle dans la limitation de l'infection par les dermatophytes. Le fait que le modèle RHE se trouve dépourvu de cellules immunitaires, de sébum et de microbiome pourrait donc expliquer la progression inhabituelle des éléments fongiques. Les conditions de culture des RHE, alliant l'absence de frottement et une forte humidité, favorisent également le développement de l'infection.

Afin de se rapprocher au maximum des conditions d'infection *in vivo* et de mieux comprendre les facteurs responsables de la limitation superficielle des éléments fongiques, il serait intéressant d'améliorer le modèle basé sur les RHE en y incorporant des cellules immunitaires et en mimant la présence de sébum et du microbiome. Les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) sont rapportés comme étant les cellules immunitaires effectrices responsables de l'élimination des éléments fongiques (Campos 2006, Heddergott 2012, Yoshikawa 2015, Cambier 2016). La co-culture des RHE avec ces cellules effectrices deviendrait un excellent moyen d'étudier le rôle de ces dernières dans la limitation de la progression et dans la résorption de l'infection. Cependant, la mise au point de ce type de co-culture présente actuellement plusieurs limitations techniques puisque les milieux de culture utilisés pour les RHE d'une part et pour les macrophages et les PMN d'autre part ne sont pas les mêmes. De plus, les PMN étant caractérisés par une courte durée de vie, ils doivent idéalement être utilisés dans les quatre heures qui suivent leur isolement (Oh 2008).

Jusqu'à présent, seul un modèle de co-culture d'équivalent cutané en présence de macrophages a été développé (Chung 2014). Dans ce modèle, les équivalents cutanés sont reconstruits dans des inserts de culture et les macrophages sont placés sous cet insert, permettant d'étudier la production de cytokines par les macrophages en réponse à une application topique de LPS sur les équivalents cutanés. Dans le contexte de l'étude des dermatophytoses, l'idéal serait un modèle de co-culture dans lequel les macrophages et les PMN pourraient migrer à travers le tissu épidermique pour atteindre les éléments fongiques et interagir directement avec ceux-ci. Un tel type de modèle n'a jamais été mis au point avec des équivalents épidermiques. Toutefois, un système de co-culture a été développé pour étudier la migration transépithéliale des PMN en réponse à l'infection par la bactérie *Escherichia coli* (Kusek 2014). Dans ce système, des cellules épithéliales pulmonaires sont cultivées en monocouche sur un filtre perméable, préalablement recouvert de collagène, et sont infectées par application topique de la bactérie *E. coli*. Cette culture est ensuite retournée et les PMN fraîchement isolés sont ensemencés sur la face basale du filtre avant de migrer vers la face apicale des cellules épithéliales. L'adaptation de ce système au RHE représenterait un modèle idéal pour évaluer le rôle des PMN et des macrophages dans l'infection par les dermatophytes. Par ailleurs, il est possible de créer du sébum synthétique à base de cires, d'acides gras et de triglycérides (Wertz 2009). L'application de cette mixture lipidique sur les RHE, avant leur infection par les arthrospores de *T. rubrum*, pourrait mimer l'action du sébum *in vivo*. Enfin le rôle du microbiome pourrait être appréhendé par une infection simultanée des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* et par des micro-organismes commensaux tels *Staphylococcus epidermidis* ou les levures *Malassezia*, représentant respectivement les espèces bactérienne et fongique les plus abondantes au sein de la flore cutanée (Paulino 2008, Grice 2011). Bien sûr, le microbiome cutané *in vivo* est composé d'un ensemble bien plus complexe et diversifié de micro-organismes impossible à reproduire dans notre modèle *in vitro* et il serait réducteur de considérer que deux espèces sont suffisantes pour mimer le microbiome. La co-infection des RHE par *T. rubrum* et *S. epidermidis* ou *Malassezia* permettrait tout de même d'évaluer les interactions possibles entre ces micro-organismes spécifiques. Dans ce sens, une co-infection des RHE par les bactéries commensale *S. epidermidis* et pathogène *Staphylococcus aureus* a déjà été réalisée et a permis de confirmer le rôle protecteur de *S. epidermidis* contre l'infection à *S. aureus* (Bäsler 2017).

L'infection d'explants cutanés humains par les arthrospores de *T. rubrum* en utilisant le même protocole que pour les RHE révèle une progression similaire, avec colonisation de la couche cornée durant les quatre premiers jours et pénétration subséquente dans les couches de kératinocytes vivants. Toutefois, l'invasion des couches vivantes semble plus limitée dans les explants cutanés que dans les RHE. La persistance de quelques cellules immunitaires et de traces de sébum dans les explants cutanés pourrait expliquer cette différence.

Finalement, l'application topique simultanée ou subséquente de miconazole, molécule antifongique bien reconnue (Barasch 2008), sur les RHE infectés permet d'inhiber l'infection. Le modèle de dermatophytose sur RHE est donc un outil valide pour tester l'efficacité de molécules antifongiques et a dès lors été utilisé pour réaliser les tests d'efficacité des peptides potentiellement préventifs développés dans le cadre du projet MycAvert (voir en annexe notre contribution au rapport de ce projet).

Le modèle de dermatophytose mis au point étant représentatif des lésions *in vivo*, il a pu être utilisé pour étudier les étapes de l'infection des épidermes par les arthrospores de *T. rubrum*, notamment les mécanismes d'adhérence et d'invasion. Par la suite, l'impact de l'infection sur la barrière épidermique et la réaction des kératinocytes face à celle-ci ont également été investigués.

2.Cycle d'infection des arthrospores de *T. rubrum* sur RHE

Le cycle d'infection des dermatophytes peut se diviser en trois étapes : l'adhérence des arthrospores aux cellules de l'hôte, la germination de celles-ci pour former des hyphes et finalement l'invasion du tissu hôte.

L'étude de la cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* au RHE a révélé que ce processus se met en place rapidement après l'infection puisque plus de 20% des arthrospores adhèrent déjà à l'épiderme hôte après une heure de contact. Ces résultats sont en accord avec d'autres études ayant montré que l'adhérence des dermatophytes aux cornéocytes est un processus continu qui se met en place durant les premières heures de contact (Zurita 1987, Baldo 2008).

Les mécanismes utilisés par les dermatophytes pour adhérer au tissu hôte sont encore trop peu connus mais feraient intervenir des molécules exprimées en surface des arthrospores et des protéases sécrétées (Baldo 2011). Précédemment, il a été démontré que la protéase à sérine fongique de type subtilisine Sub3 est impliquée dans l'adhérence des arthrospores de *M. canis* à l'épiderme humain ou d'autres espèces animales (Baldo 2008, Baldo 2010, Bagut 2012). Au cours de notre recherche, nous avons montré que la présence de chymostatine, inhibiteur des protéases à sérine, induit une diminution de l'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE durant les premières heures qui suivent leur infection. Cette perte d'adhérence résulte, quatre jours après l'infection, en une réduction du taux d'infection, mesuré par qPCR, et du niveau d'invasion du tissu, visible par analyse histologique. Ces résultats suggèrent que la protéase fongique Sub3 pourrait également être impliquée dans les mécanismes d'adhérence des arthrospores de l'espèce *T. rubrum* à l'épiderme humain. Le mécanisme exact par lequel Sub3 intervient dans l'adhérence n'est par contre pas encore élucidé. Une hypothèse propose que Sub3 puisse modifier des protéines en surface des arthrospores ou des cellules hôtes, facilitant de ce fait leurs interactions. Par ailleurs, d'autres protéases à sérine sont sécrétées par les dermatophytes au cours de l'infection (Monod 2008), notamment la dipeptidyl-peptidase DppIV qui est sécrétée par les arthrospores de *M. canis* dans les étapes précoces de l'infection (Mathy 2010). De plus, la famille des subtilisines compte douze protéases (Descamps 2002, Jousson 2004) qui pourraient jouer des rôles complémentaires et également intervenir dans les étapes précoces de l'infection. La perte d'adhérence provoquée par la chymostatine pourrait dès lors résulter d'une inhibition de Sub3, mais aussi d'autres subtilisines ou d'autres protéases impliquées dans l'étape d'adhérence.

La meilleure façon d'évaluer l'implication spécifique de Sub3 dans les mécanismes d'adhérence de *T. rubrum*, et par la suite des autres protéases fongiques, serait l'invalidation des gènes qui codent ces protéases. La manipulation génétique chez les dermatophytes requiert des méthodes difficiles à mettre en œuvre : les techniques de transformation et les

marqueurs de sélection sont limités et leur efficacité est très variable d'une espèce à l'autre (Alshahni 2017). De plus, la recombinaison homologue n'est pas courante chez les dermatophytes, ce qui complique la manipulation génétique ciblée. Toutefois, des progrès ont été réalisés dans ce domaine permettant d'introduire des modifications ciblées dans le génome de différentes espèces de dermatophytes, dont les espèces *T. benhamiae* et *Trichophyton mentagrophytes* (Yamada 2009, Alshahni 2011, Grumbt 2011). Une souche de *M. canis* invalidée pour Sub3 a également été mise au point par la méthode d'interférence ARN mais les effets phénotypiques et le niveau de déplétion de l'ARNm étaient variables d'un clone à l'autre (Vermout 2007). Une perspective intéressante serait donc de développer une technique de manipulation génétique chez l'espèce *T. rubrum* afin de produire des souches de ce dermatophyte invalidées pour Sub3, et plus tard pour d'autres protéases, et d'en étudier l'adhérence sur le modèle RHE.

Il faut également garder à l'esprit que les protéases exprimées par les dermatophytes *in vitro* lors de la dégradation de milieux protéiques et *in vivo* lors de l'infection de l'hôte ne sont pas nécessairement les mêmes. De fait, alors que Sub3, Sub4 et MEP4 sont les protéases majoritairement exprimées *in vitro* (Mignon 1998, Leng 2009), Sub6 semble être la protéase principalement exprimée *in vivo* (Staib 2010, Méhul 2016, Tran 2016). Il est donc important d'étudier l'implication des protéases fongiques et des autres facteurs de virulence des dermatophytes dans des conditions les plus proches possibles de l'infection *in vivo*. Le phénotypage des dermatophytes pendant l'infection des RHE par *RNA Sequencing*, comme cela a déjà été réalisé lors de l'infection du cobaye par *T. benhamiae* (Tran 2016), permettrait de vérifier si les dermatophytes se comportent au contact des RHE de manière similaire à l'infection cutanée *in vivo*.

Outre les protéases sécrétées, l'adhérence des arthrospores à l'épiderme hôte fait également intervenir des protéines de type adhésine (Esquenazi 2003, Esquenazi 2004) et des hydrates de carbone (Grando 1992) présents en surface des arthrospores. Toutefois ces molécules ainsi que leurs cibles sur les cellules hôtes restent relativement peu connues.

Durant la germination, les arthrospores bourgeonnent et produisent les tubes germinatifs, qui deviendront les hyphes aptes à envahir le tissu hôte. L'analyse en microscopie électronique à balayage (MEB) des RHE infectés révèle que les arthrospores de *T. rubrum* commencent à produire des tubes germinatifs déjà quatre heures après l'infection. Après six heures, les arthrospores sont devenues des hyphes allongées et segmentées par des septa qui continuent de croître. En étudiant le développement des conidies de *T. rubrum* ensemencées sur gélose de Sabouraud, Liu et collaborateurs avaient précédemment montré une émergence des tubes germinatifs après seulement 9 à 10 heures (Liu 2007). Cette disparité entre nos observations et celles de Liu et collaborateurs est en accord avec une autre étude qui a démontré que les arthrospores produisent plus rapidement des hyphes que les conidies (Zurita 1987). Il avait d'ailleurs été observé que les arthrospores de *T. mentagrophytes* et *Trichophyton interdigitale* entrent en germination dès quatre heures de contact avec des cornéocytes (Aljabre 1992, Aljabre 1993). Le fait que les arthrospores et les conidies ne se développent pas à la même vitesse constitue un argument supplémentaire en faveur de l'emploi d'arthrospores en tant que spores infectantes dans la modélisation *in vitro* des dermatophytoses.

Par ailleurs, l'activité de la protéine kinase p38 fongique, partageant 50% d'identité avec la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38 humaine, semble nécessaire à la mise en place correcte de la germination des arthrospores de *T. rubrum*. En effet, le développement de colonies sur gélose de Sabouraud est perturbé en présence de l'inhibiteur PD169316 spécifique de la MAPK p38. Les colonies se développent plus lentement et sont plus petites et plus compactes en présence de l'inhibiteur PD169316 tandis que les hyphes apparaissent plus fines et moins septées. Toutefois, bien que présentant un aspect modifié, les colonies se développent tout de même sur milieu solide en présence de l'inhibiteur PD169316, avec un délai. Le rôle de la protéine kinase p38 fongique n'a jamais été investigué et le mécanisme par lequel elle est impliquée dans la croissance des arthrospores de *T. rubrum* n'est pas connu. Ces observations soulignent une fois de plus la nécessité d'améliorer les connaissances actuelles en ce qui concerne la biologie des dermatophytes. En outre, l'inhibition de la protéine kinase p38 fongique par l'inhibiteur PD169316 résulte en un retard du développement de l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum*. La protéine kinase p38 fongique représente dès lors une cible potentiellement intéressante pour le développement d'un traitement prophylactique contre les dermatophytoses.

Finalement, la dernière étape du cycle d'infection consiste en l'invasion du tissu hôte par les hyphes. D'après les observations réalisées en MEB et en microscopie électronique à transmission (MET), il apparaît que les hyphes de *T. rubrum* envahissent la couche cornée des RHE par progression entre les cornéocytes. Ceci est en accord avec de précédentes études ayant observé la présence des hyphes de *T. mentagrophytes* entre les cornéocytes lors de l'infection de cornéocytes en suspension (Aljabre 1993), de fragments de couche cornée (Aljabre 1992) ou d'explants cutanés humains (Duek 2004). Cette progression intercellulaire des hyphes fongiques suggère une dégradation des cornéodesmosomes et de la matrice lipidique. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les dermatophytes sécrètent de nombreuses protéases (Monod 2008) ainsi que des lipases et des phospholipases (Muhsin 1997), mais nécessite des expériences supplémentaires pour être confirmée, par exemple une analyse par Western blot de la dégradation des protéines des cornéodesmosomes. Il pourrait également être intéressant d'étudier l'invasion par *T. rubrum* de RHE obtenus à partir de kératinocytes isolés de patients atteints de « *peeling skin disease* », une maladie héréditaire due à une mutation dans le gène encodant la cornéodesmosine (CDSN). L'épiderme de ces patients est caractérisé par une absence d'expression de la CDSN et par l'établissement de cornéodesmosomes inefficaces résultant en de la desquamation intense (Jonca 2011). Des RHE ont déjà pu être reconstruits avec succès à partir de kératinocytes provenant de ces patients et montrent les mêmes défauts d'expression de la CDSN et de cohésion de la couche cornée (Jonca 2011, Valentin 2015). Par ailleurs, en analysant par MET des biopsies humaines de lésions cutanées de dermatophytose à *T. rubrum*, Jensen et collaborateurs ont observé la présence d'éléments fongiques dans les espaces intercellulaires de la couche cornée, mais également à l'intérieur des cornéocytes (Jensen 2007). Il semble dès lors que, dans les lésions *in vivo*, les hyphes de *T. rubrum* envahissent le tissu hôte par progression à la fois entre les cornéocytes et à travers ceux-ci, probablement grâce à leur capacité de dégradation de la kératine (Grumbt 2013).

3.Impacts de l'infection sur la barrière épidermique et réaction des kératinocytes

Le modèle de dermatophytose sur RHE a permis d'évaluer les effets de l'infection sur la fonction de barrière de l'épiderme, ainsi que d'appréhender les réponses mises en place par les kératinocytes dans leur tentative pour contrer l'infection.

Les mesures de la résistance électrique transépithéliale et de la perméabilité *outside-in* à la Lucifer Yellow au cours de l'infection ont montré que l'intégrité de la barrière épidermique des RHE était rompue au quatrième jour suivant leur infection par les arthrospores de *T. rubrum*. Au même moment, l'efficacité des jonctions étanches (TJ) est également altérée comme cela a pu être démontré par un test de perméabilité *inside-out* utilisant la biotine. En combinant les tests de barrière et l'analyse morphologique des RHE infectés par coloration histochimique et par MET, il semble que les éléments fongiques perturbent peu à peu la couche cornée de l'épiderme pendant qu'ils progressent à travers celle-ci durant les trois premiers jours d'infection. A ce stade, l'intégrité de la barrière épidermique est toujours maintenue par les TJ. Par contre, au quatrième jour, l'infection résulte en une perte d'efficacité des TJ, ce qui provoque une rupture soudaine de la barrière épidermique.

La perturbation de la couche cornée pourrait être expliquée par une dégradation des cornéodesmosomes, de la matrice lipidique et de la kératine par les enzymes sécrétées par les dermatophytes, comme discuté ci-dessus. En ce qui concerne l'altération des TJ, deux mécanismes sont à envisager. Premièrement les dermatophytes pourraient dégrader les protéines des TJ, notamment les protéines transmembranaires occludine et claudines, via la sécrétion de protéases. Une analyse des protéines de TJ par Western blot permettrait de tester cette première hypothèse. D'autre part, l'infection pourrait induire une relocalisation des protéines de TJ conduisant à une perte d'efficacité de ces dernières. En effet, il est intéressant de signaler qu'une relocalisation des protéines de TJ en cas d'infection cutanée a déjà été observée dans le cas de l'infection par la bactérie *S. aureus* (Ohnemus 2008, Bäsler 2017). Plutôt en accord avec cette deuxième hypothèse, les immunomarquages réalisés ont montré une internalisation de la claudine-1 au quatrième jour suivant l'infection. L'étude de la distribution des autres protéines de TJ, dont l'occludine et la protéine ZO-1, permettrait peut-être de renforcer cette hypothèse.

Récemment, l'activation de la MAPK p38 dans un modèle d'épiderme humain reconstruit a été associée à une redistribution des protéines de TJ, résultant en une perte de l'intégrité de la barrière épidermique (Kanemaru 2017). De plus, la MAPK p38 se trouve activée dans les RHE et son activation a été observée en réponse à l'infection par les dermatophytes (Achterman 2015). Il est dès lors légitime d'envisager qu'elle puisse être responsable de la perte de barrière épidermique mesurée dans le modèle de dermatophytose sur RHE. La MAPK p38 existe sous quatre isoformes dont trois sont exprimées dans l'épiderme humain : p38 α , p38 β et p38 δ (Dashti 2001a). Outre son implication dans la réponse cellulaire au stress, la MAPK p38, en particulier les isoformes p38 α et p38 δ , participe également à la régulation de la différenciation des kératinocytes en influençant l'expression de l'involucrine (Dashti 2001a, Dashti 2001b, Efimova 2003, Jans 2004). L'inhibiteur PD169316 spécifique de la MAPK p38 perturbe le développement de l'infection des RHE par *T. rubrum*, probablement dû à un effet direct de cet inhibiteur sur la croissance des arthrospores. En effet, quatre jours après l'infection, le niveau d'invasion des RHE par les hyphes fongiques est fortement réduit en

présence de l'inhibiteur. Des résultats préliminaires suggèrent toutefois que, bien que de manière retardée, les arthrospores de *T. rubrum* produisent des hyphes capables d'envahir les RHE en présence de l'inhibiteur PD169316. Cette infection retardée des RHE s'accompagne également d'une perte de la barrière épidermique, suggérant que l'activité de la MAPK p38 humaine ne serait pas impliquée dans les perturbations de la barrière en réponse à l'infection. L'utilisation d'autres inhibiteurs est toutefois requise pour cerner le rôle précis de la MAPK p38, et de ses différentes isoformes. Il semblerait en effet que l'inhibiteur PD169316 inhibe l'activité des isoformes p38 α et p38 β de la MAPK p38, mais pas celle de l'isoforme p38 δ (Jans 2004).

Par ailleurs, Jensen et collaborateurs ont observé dans des biopsies humaines de lésions cutanées de dermatophytose une redistribution des marqueurs de différenciation épidermiques involucrine, loricrine et filaggrine, ainsi qu'une perturbation de l'exocytose des corps lamellaires (Jensen 2007). Bien que nous n'ayons pas observé de modification importante dans le profil d'expression des marqueurs de différenciation épidermique au cours de l'infection des RHE par *T. rubrum*, leur redistribution au sein du tissu ne peut pas être exclue. Ainsi, la différenciation de l'épiderme pourrait être altérée lors de l'infection et participer à la faiblesse de la barrière épidermique. La réalisation d'immunomarquages des marqueurs de différenciation sur les RHE infectés permettrait d'appréhender cette hypothèse. Enfin, la perturbation de l'exocytose des corps lamellaires pourrait faire suite à la désorganisation des TJ, puisque ces dernières participent à la polarisation cellulaire (Kuroda 2010), et renforcer les altérations de la barrière épidermique.

Les kératinocytes réagissent à l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* via une augmentation de l'expression et de la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β , TNF α , IL-8, TSLP) et de peptides antimicrobiens (PAM) (hBD2, hBD3, S100A7) principalement au quatrième jour suivant l'infection. Différentes études avaient déjà investigué les cytokines produites *in vitro* par les kératinocytes en réponse à la présence de dermatophytes (Nakamura 2002, Achterman 2015). Toutefois, la réponse des kératinocytes varie fortement en fonction de l'espèce de dermatophyte infectante, les espèces zoophiles provoquant généralement une réponse inflammatoire de plus grande ampleur que les espèces anthropophiles (Shiraki 2006, Tani 2007), d'où l'importance de caractériser spécifiquement les réponses mises en place pour chaque espèce. Dans ce sens, il serait intéressant de mettre à profit le modèle de dermatophytose sur RHE et son adaptabilité à différentes espèces de dermatophytes en étudiant les cytokines produites par les kératinocytes en réponse à l'infection par différentes espèces zoophiles et anthropophiles.

Les cytokines produites par les kératinocytes durant l'infection permettent de recruter le système immunitaire afin de mettre en place une défense efficace et spécifique contre les dermatophytes. Actuellement, la réponse immunitaire protectrice contre les dermatophytes est supposée être une coopération entre les voies cellulaires Th1 et Th17. Le profil cytokinique observé dans le modèle de dermatophytose sur RHE est compatible avec cette hypothèse. Une analyse multiplexe à plus large échelle permettrait d'identifier d'autres cytokines produites en réponse à l'infection et d'avoir une idée plus précise des cellules immunitaires qui seraient recrutées. Une autre façon de procéder consisterait à stimuler des lymphocytes T naïfs avec le milieu de culture des RHE infectés et d'identifier la voie de différenciation empruntée par ces lymphocytes. De manière plus précise, un modèle de co-culture des RHE avec des lymphocytes T naïfs, développé actuellement par le Dr. Evelyne De Vuyst dans notre laboratoire, permettrait d'observer directement les modifications phénotypiques de ces

lymphocytes en réponse à l'infection des RHE par les dermatophytes. En parallèle, l'étude des cytokines produites par des cellules dendritiques en réponse à la présence des arthrospores de *T. rubrum* compléterait l'analyse du profil cytokinique général propre à l'infection.

Les PAM participent à l'élimination de l'infection par leur effet direct sur les dermatophytes (Jiang 2010, Fritz 2012, Firat 2014). De plus, les β -défensines hBD2 et hBD3 induisent la prolifération des kératinocytes et accélèrent le renouvellement de l'épiderme (Niyonsaba 2007), favorisant l'élimination des éléments fongiques par desquamation.

La survenue simultanée de la production de cytokines et de PAM par les kératinocytes, ainsi que de la rupture de la barrière épidermique lors de l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum*, suggère que ces deux événements sont liés. Dans une première hypothèse, la rupture de la barrière épidermique serait préalable à l'activation des kératinocytes. La perte d'intégrité de la barrière permettrait en effet un contact direct entre les dermatophytes et les kératinocytes vivants de la couche granuleuse, ceux-ci étant capables de reconnaître certains composants de la paroi fongique (Netea 2008) et de produire des cytokines et des PAM. Cependant, une perturbation de la barrière épidermique peut entraîner à elle seule l'expression de certaines cytokines (de Koning 2011). Il se pourrait donc que les kératinocytes réagissent de manière plutôt aspécifique à la perte de barrière provoquée par l'infection. Une mesure de l'expression et de la libération des cytokines et des PAM par les kératinocytes en réponse au traitement des RHE par le SDS, connu pour induire une rupture de la barrière épidermique, permettrait de vérifier cette éventualité. Une seconde hypothèse pourrait proposer que la production de cytokines induise la rupture de barrière. Ainsi, au quatrième jour suivant l'infection, les kératinocytes détecteraient la présence des éléments fongiques qui se trouvent à proximité de la couche granuleuse, notamment via la reconnaissance de protéases fongiques sécrétées (Brouta 2003, Descamps 2003). Les kératinocytes produiraient alors des cytokines capables de provoquer la rupture de la barrière épidermique par déstabilisation des TJ (Kirschner 2009). La stimulation de RHE non-infectés avec le milieu de culture des RHE infectés et la réalisation subséquente de tests de barrière permettraient de tester cette deuxième hypothèse.

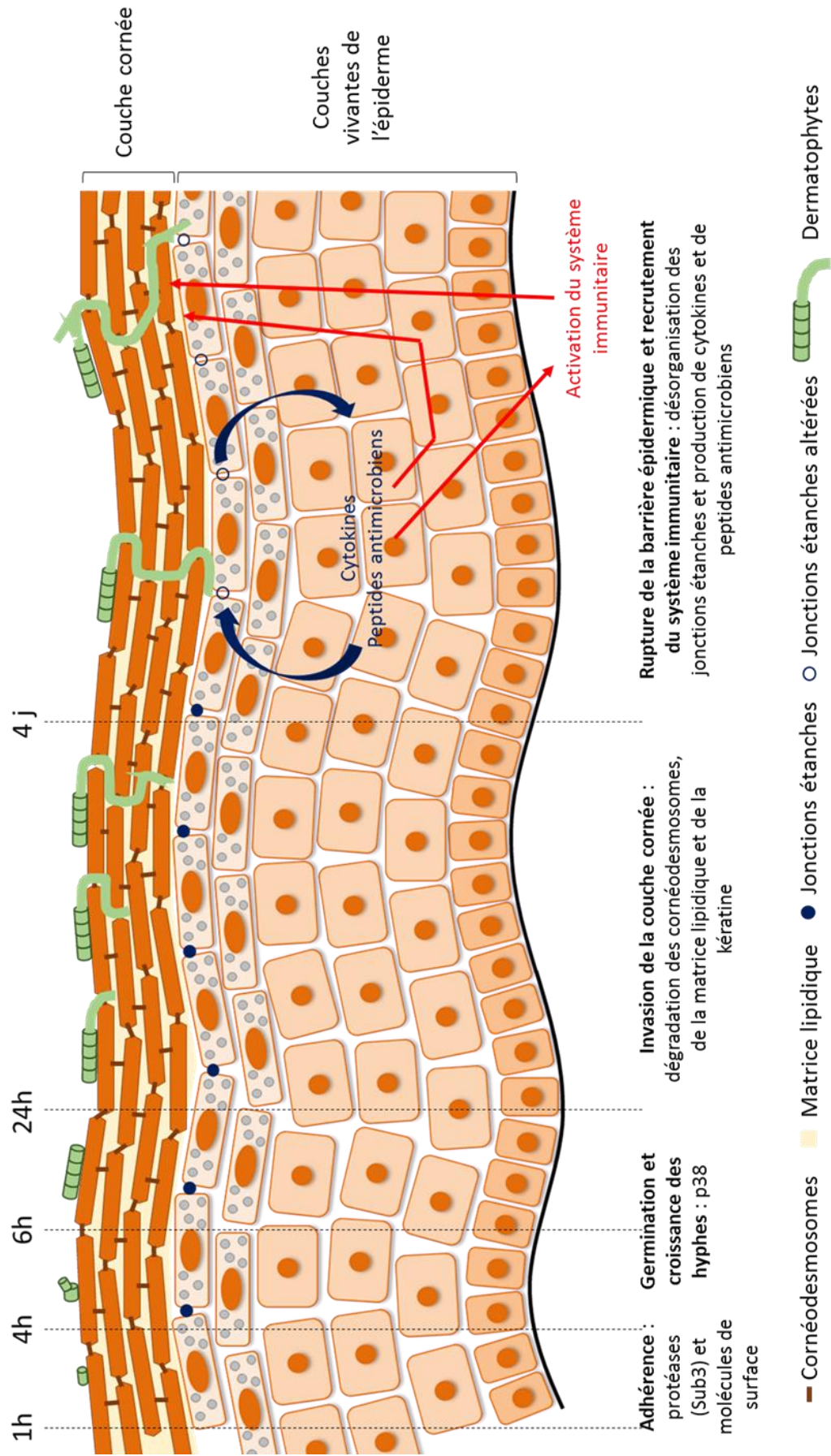
La reconnaissance des éléments fongiques par les kératinocytes se fait probablement via les *toll-like receptor* (TLR), principalement les TLR2, 4 et 6 dont l'expression dans les kératinocytes est modifiée en réponse à la présence de dermatophytes *in vitro* (Garcia-Madrid 2011) et *in vivo* (Brasch 2014). Bien que l'expression des ARNm des TLR2, 5 et 6 par les kératinocytes ne soit pas modifiée durant l'infection des RHE, leur implication dans la reconnaissance fongique n'est toutefois pas à exclure.

4. Conclusion

En combinant les informations déjà reprises dans la littérature et les nouvelles données apportées par cette thèse, nous pouvons proposer un schéma qui intègre les événements et mécanismes impliqués dans la mise en place de l'infection de l'épiderme humain par le dermatophyte anthropophile *T. rubrum* (**Figure 18**). Premièrement, les arthrospores entrent en contact avec l'épiderme hôte et y adhèrent par un mécanisme faisant intervenir des protéases fongiques, dont probablement Sub3, mais également des interactions entre protéines et hydrates de carbone à la surface des arthrospores et des cornéocytes. L'adhérence est un processus rapide qui se met en place dès les premières heures de contact.

Après seulement quatre heures, les arthrospores commencent à bourgeonner et à produire des tubes germinatifs qui deviendront des hyphes allongées et segmentées par septa dès la sixième heure de contact. La germination des arthrospores et la croissance des hyphes nécessiteraient l'activité de la protéine kinase p38 fongique homologue de la MAPK p38 humaine. Ces processus sont en effet ralentis en présence d'un inhibiteur de la MAPK p38. Après 24 heures, les hyphes commencent à envahir l'épiderme hôte en se glissant entre les cornéocytes, probablement par dégradation des cornéodesmosomes et de la matrice lipidique. Les hyphes progressent alors au travers de la couche cornée en passant entre les cornéocytes mais également peut-être à travers ceux-ci, via la digestion de la kératine, pour arriver enfin au contact de la couche granuleuse au quatrième jour suivant l'infection. A ce stade, deux événements surviennent : la désorganisation des TJ, induisant la perte subite de l'intégrité de la barrière épidermique, et l'activation des kératinocytes vivants de la couche granuleuse qui produisent alors des cytokines pro-inflammatoires et des PAM. Ces deux événements sont probablement liés et deux hypothèses sont proposées : dans la première, la perte de la barrière épidermique permettrait un contact direct entre dermatophytes et kératinocytes de la couche granuleuse ce qui induirait l'activation de ces derniers. Dans la seconde hypothèse, les kératinocytes de la couche granuleuse détecteraient la présence des éléments fongiques localisés à proximité et produiraient alors des cytokines et des PAM qui à leur tour induiraient les perturbations de la barrière épidermique. Quoi qu'il en soit, les cytokines et PAM produits à ce stade entraînent l'activation du système immunitaire qui deviendra responsable du contrôle de l'infection observé *in vivo*, empêchant les éléments fongiques de progresser dans les couches plus profondes de l'épiderme, et plus tard de sa résorption. Les PAM participent également au contrôle de l'infection par leur effet direct sur les micro-organismes pathogènes et par induction de la prolifération des kératinocytes, et par conséquent de la desquamation épidermique. Dans le modèle d'épiderme humain reconstruit, l'absence de système immunitaire semble permettre aux éléments fongiques d'envahir les couches vivantes de l'épiderme dès la rupture des TJ.

↓ **Figure 18** : Schéma récapitulatif de l'infection de l'épiderme humain par le dermatophyte anthropophile *T. rubrum*. Dès la première heure de contact, les arthrospores adhèrent à l'épiderme hôte par un mécanisme faisant intervenir des protéases fongiques et des molécules de surface. Après quatre heures, les arthrospores produisent des tubes germinatifs qui deviennent des hyphes segmentées par septa dès six heures de contact. La germination des arthrospores et la croissance des hyphes nécessitent l'activité de la protéine kinase p38 fongique. Dès 24 heures et durant les trois jours suivant l'infection, les hyphes envahissent la couche cornée en progressant dans les espaces intercellulaires et à travers les cornéocytes via la dégradation probable des cornéodesmosomes, de la matrice lipidique et de la kératine. Au quatrième jour après l'infection, les éléments fongiques ont atteint la limite entre les couches cornée et granuleuse. A ce stade l'intégrité de la barrière épidermique est rompue, suite à la perte de fonctionnalité des jonctions étanches, et simultanément les kératinocytes réagissent à l'infection par production de cytokines pro-inflammatoires et de peptides antimicrobiens qui seront responsables *in vivo* de l'activation du système immunitaire et de la résolution éventuelle de l'infection. Ces derniers événements, représentés par des flèches rouges sur le schéma, ne surviennent pas dans le modèle *in vitro* sur RHE dépourvu des éléments cellulaires du système immunitaire.



↑ **Figure 18**

En conclusion, ce travail avait pour objectif d'améliorer les connaissances actuelles en ce qui concerne les mécanismes mis en place par les arthrospores de dermatophytes pour adhérer et envahir le tissu hôte, ainsi que la réponse précoce des kératinocytes face à l'infection. Bien que des éléments de réponses aient été apportés, certains mécanismes restent encore à préciser et de nombreuses et nouvelles questions ont également été soulevées. D'une part, cette recherche a souligné le manque de connaissance et de compréhension de la biologie des dermatophytes, pourtant indispensable au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques et prophylactiques. Une perspective de taille est certainement le développement des outils de manipulation génétique chez les dermatophytes, plus particulièrement chez l'espèce *T. rubrum*, afin d'identifier les mécanismes de croissance, d'adhérence et de prolifération de ces organismes. La manipulation génétique ciblée étant difficile à mettre en œuvre chez les dermatophytes (Alshahni 2017), une méthode de mutagenèse aléatoire basée sur l'insertion de transposons dans le génome de *T. rubrum* permettrait d'identifier des gènes impliqués dans la survie et le développement de ce dermatophyte mais également dans les étapes de l'infection. Cette technique a déjà été utilisée avec succès chez plusieurs champignons filamenteux (Jiang 2013), notamment chez *Aspergillus fumigatus* (Firon 2003) et chez *Fusarium oxysporum* (Lopez-Berges 2009) pour identifier respectivement des gènes nécessaires à la croissance ou des facteurs de virulence. D'autre part, les limites du modèle d'épiderme humain reconstruit, principalement l'absence de cellules immunitaires, rendent inaccessible l'étude complète des mécanismes de défense initiés par l'intermédiaire des kératinocytes pour lutter contre l'invasion de l'épiderme par les dermatophytes. La sophistication de ce modèle, particulièrement la mise au point d'une co-culture avec des cellules du système immunitaire, permettrait des avancées significatives dans l'étude des maladies épidermiques, dans le contexte des dermatophytoses, mais aussi dans le cadre d'autres maladies infectieuses ou à composante immunitaire.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Rahman, S. M. (2017). "Genetic predictors of susceptibility to dermatophytoses." Mycopathologia **182**: 67-76.
- Abe, S., Miura, K., Kinoshita, A., Mishima, H., Miura, S., Yamasaki, K. *et al.* (2013). "Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer." Journal of Human Genetics **58**: 250-253.
- Achterman, R., White, T. (2012). "A foot in the door for dermatophyte research." PLoS Pathogens **8**: e1002564.
- Achterman, R., Moyes, D., Thavaraj, S., Smith, A., Blair, K., Withe, T., Neglik, J. (2015). "Dermatophytes activate skin keratinocytes via mitogen-activated protein kinase signaling and induce immune responses." Infection and Immunity **83**: 1705-1714.
- Aljabre, S., Richardson, M., Scott, E., Shankland, G. (1992). "Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum *in vitro*." Journal of Medical and Veterinary Mycology **30**: 145-152.
- Aljabre, S., Richardson, M., Scott, E., Rashid, A., Shankland, G. (1993). "Adherence of arthroconidia and germlings of anthropophilic and zoophilic varieties of *Trichophyton mentagrophytes* to human corneocytes as an early event in the pathogenesis of dermatophytosis." Clinical and Experimental Dermatology **18**: 231-235.
- Almeida, S. (2008). "Immunology of dermatophytosis." Mycopathologia **166**: 277-283.
- Alshahni, M., Yamada, T, Takatori, K, Sawada, T, Makimura, K (2011). "Insights into a nonhomologous integration pathway in the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*: efficient targeted gene disruption by use of mutants lacking ligase IV." Microbiology and Immunology **55**: 34-43.
- Alshahni, M., Yamada, T. (2017). "Genetic manipulations in dermatophytes." Mycopathologia **182**: 33-43.
- Altmeier, S., LeibundGut-Landmann, S. (2017). "Immunity to fungal infections." Immunogenetics of Fungal Diseases: **Carvalho A. (eds)**: 35-83.
- Asz-Sigall, D., Lopez-Garcia, L., Vega-Memije, M., Lacy-Niebla, R., Garcia-Corona, C., Ramirez-Renteria, C. *et al.* (2010). "HLA-DR6 association confers increased resistance to *T. rubrum* onychomycosis in Mexican Mestizos." International Journal of Dermatology **49**: 1406-1409.
- Asz-Sigall, D., Totsi, A, Arenas, R (2017). "Tinea unguium: diagnosis and treatment in practice." Mycopathologia **182**: 95-100.
- Avelar Pires, C., Monteiro Lobato, A., Oliveira Carneiro, F., Santos da Cruz, N., Oliveira de Sousa, P., Darwich Mendes, A. (2014). "Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis." Anais Brasileiros de Dermatologia **89**: 259-264.
- Baek, J., Lee, S., Choi, K., Choi, E., Lee, S. (2013). "Acute modulations in *stratum corneum* permeability barrier function affect claudin expression and epidermal tight junction function via changes of epidermal calcium gradient." Yonsei Medical Journal **54**: 523-528.
- Bagut, E., Baldo, A., Mathy, A., Cambier, L., Antoire, N., Cozma, V., Mignon, B. (2012). "Subtilisin Sub3 is involved in adherence of *Microsporium canis* to human an animal epidermis." Veterinary Microbiology **160**: 413-419.
- Bahar, A., Ren, D. (2013). "Antimicrobial peptides." Pharmaceuticals **6**: 1543-1575.
- Baldo, A., Mathy, A., Vermout, S., Tabart, J., Losson, B., Mignon, B. (2007). "Les mécanismes d'adhérence des champignons responsables de mycoses superficielles." Annales de Médecine Vétérinaire **151**: 192-199.
- Baldo, A., Tabart, J., Vermout, S., Mathy, A., Collard, A., Losson, B., Mignon, B. (2008). "Secreted subtilisins of *Microsporium canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes." Journal of Medical Microbiology **57**: 1152-1156.
- Baldo, A., Mathy, A., Tabart, J., Camponova, P., Vermout, S., Massart, L. *et al.* (2010). "Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporium canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis." British Journal of Dermatology **162**: 990-997.

- Baldo, A., Monod, M., Mathy, A., Cambier, L., Bagut, E., Defaweux, V. *et al.* (2011). "Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes." Mycoses **55**: 218-223.
- Baldo, A., Chevigné, A., Dumez, M., Mathy, A., Power, P., Tabart, J. *et al.* (2012). "Inhibition of the keratinolytic subtilisin protease Sub3 from *Microsporum canis* by its propeptide (proSub3) and evaluation of the capacity of proSub3 to inhibit fungal adherence to feline epidermis." Veterinary Microbiology **159**: 479-484.
- Barasch, A., Voinea Griffin, A. (2008). "Miconazole revisited: new evidence of antifungal efficacy from laboratory and clinical trials." Future Microbiology **3**: 265-269.
- Barrandon, Y., Green, H. (1987). "Three clonal types of keratinocytes with different capacities for multiplication." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **84**: 2302-2306.
- Bäsler, K., Bergmann, S., Heisig, M., Naegel, A., Zorn-Kruppa, M., Brandner, J. (2016). "The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption." Journal of Controlled Release **S0168-3659(16)30508-9**.
- Bäsler, K., Galliano, M., Bergmann, S., Rohde, H., Wladykowski, E., Vidal-y-Sy, S. *et al.* (2017). "Biphasic influence of *Staphylococcus aureus* on human epidermal tight junctions." Annals of the New York Academy of Sciences **1405**: 53-70.
- Belkaid, Y., Segre, J. (2014). "Dialogue between skin microbiota and immunity." Science **346**: 954-959.
- Bitencourt, T., Macedo, C., Franco, M., Assis, A., Komoto, T., Stehling, E. *et al.* (2016). "Transcription profile of *Trichophyton rubrum* conidia grown on keratin reveals the induction of an adhesin-like protein gene with a tandem repeat pattern." BMC Genomics **17**: 249.
- Blake, J., Dahl, M., Herron, M., Nelson, R. (1991). "An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*." Journal of Investigative Dermatology **96**: 657-661.
- Blanco, J., Garcia, M. (2008). "Immune response to fungal infection." Veterinary Immunology and Immunopathology **125**: 47-70.
- Bonifaz, A., Araiza, J., Koffman-Alfaro, S., Paredes-Solis, V., Cuevas-Covarrubias, S., Rivera, M. (2004). "Tinea imbricata: autosomal dominant pattern of susceptibility in a polygamous indigenous family of the Nahuatl zone in Mexico." Mycoses **47**: 288-291.
- Botek, A., Lookingbill, D. (2001). "The structure and function of sebaceous gland." The Biology of the Skin **Freinkel R., Woodley D. (eds)**: 87-100.
- Bowman, S., Free, S (2006). "The structure and synthesis of the fungal cell wall." BioEssays **28**: 799-808.
- Braff, M., Di Nardo, A., Gallo, R. (2005a). "Keratinocytes store the antimicrobial peptide cathelicidin in lamellar bodies." Journal of Investigative Dermatology **124**: 394-400.
- Braff, M., Bardan, A., Nizet, V., Gallo, R. (2005b). "Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides." Journal of Investigative Dermatology **125**: 9-13.
- Brakhage, A., Bruns, S., Thywissen, A., Zipfel, P., Behnsen, J. (2010). "Interaction of phagocytes with filamentous fungi." Current Opinion in Microbiology **13**: 409-415.
- Brandner, J., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C. *et al.* (2002). "Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes." European Journal of Cell Biology **81**: 253-263.
- Brandner, J. (2007). "Pores in the epidermis: aquaporins and tight junctions." International Journal of Cosmetic Science **29**: 413-422.
- Brandner, J., Haftek, M., Niessen, C. (2010). "Adherens junctions, desmosomes and tight junctions in epidermal barrier function." The Open Dermatology Journal **4**: 14-20.
- Brandner, J. (2016). "Importance of tight junctions in relation to skin barrier function." Current Problems in Dermatology **49**: 27-37.
- Brasch, J., Mörig, A., Neumann, B., Proksch, E. (2014). "Expression of antimicrobial peptides and toll-like receptors is increased in tinea and pityriasis versicolor." Mycoses **57**: 147-152.

- Brogden, N., Mehalick, L., Fischer, C., Wertz, P., Brodgen, K. (2012). "The emerging role of peptides and lipids as antimicrobial epidermal barriers and modulators of local inflammation." Skin Pharmacology and Physiology **25**: 167-181.
- Brouta, F., Descamps, F., Fett, T., Losson, B., Gerday, C., Mignon, B. (2001). "Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*." Medical Mycology **39**: 269-275.
- Brouta, F., Descamps, F., Vermout, S., Monod, M., Losson, B., Mignon, B. (2003). "Humoral and cellular immune response to a *Microsporum canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pigs." Medical Mycology **41**: 495-502.
- Calderon, R., Hay, R. (1984). "Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. II. Adoptive transfer of immunity to dermatophyte infection by lymphoid cells from donors with acute or chronic infections." Immunology **53**: 465-472.
- Cambier, L., Defaweux, V., Baldo, A., Mathy, A., Tabart, J., Bagut, E. *et al.* (2010). "Rôle des cellules Th17 dans les maladies infectieuses et auto-immunes." Annales de Médecine Vétérinaire **154**: 104-112.
- Cambier, L., Mathy, A., Baldo, A., Bagut, E., Tabart, J., Antoine, N., Mignon, B. (2013). "Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to *Microsporum canis*." Veterinary Microbiology **162**: 800-805.
- Cambier, L., Weatherspoon, A., Defaweux, V., Bagut, E., Heinen, M., Antoine, N., Mignon, B. (2014). "Assessment of the cutaneous response during *Arthroderma benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* infection using an experimental mouse model." British Journal of Dermatology **170**: 625-633.
- Cambier, L., Heinen, M., Bagut, E., Antoine, N., Mignon, B. (2016). "Overexpression of TLR-2 and TLR-4 mRNA in feline polymorphonuclear neutrophils exposed to *Microsporum canis*." Veterinary Dermatology **27**: 78-e22.
- Cambier, L., Heinen, M., Mignon, B. (2017). "Relevant animal models in dermatophyte research." Mycopathologia **182**: 229-240.
- Campos, M., Russo, M., Gomes, E., Almeida, S. (2006). "Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*." Microbes and Infection **8**: 372-379.
- Candi, E., Schmidt, R., Melino, G. (2005). "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." Nature Reviews Molecular Cell Biology **6**: 328-340.
- Carlisle, D., Inouye, J., King, R., Jones, H. (1974). "Significance of serum fungal inhibitory factor in dermatophytosis." Journal of Investigative Dermatology **63**: 239-241.
- Casadevall, A. (1995). "Antibody immunity and invasive fungal infections." Infection and Immunity **63**: 4211-4218.
- Caubet, C., Jonca, N., Lopez, F., Estève, J., Simon, M., Serre, G. (2004a). "Homo-oligomerization of human corneodesmosin is mediated by its N-terminal glycine loop domain." Journal of Investigative Dermatology **122**: 747-754.
- Caubet, C., Jonca, N., Brattsand, M., Guerrin, M., Bernard, D., Schmidt, R. *et al.* (2004b). "Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hKA and SCCE/KLK7/hK7." Journal of Investigative Dermatology **122**: 1235-1244.
- Chakir, H., Wang, H., Lefebvre, D., Webb, J., Scott, F. (2003). "T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3." Journal of Immunological Methods **278**: 157-169.
- Chang, S., Hsu, S., Tien, K., Hsiao, J., Lin, S., Vhen, H., Hsieh, M. (2008). "Metabolic syndrome associated with toenail onychomycosis in Taiwanese with diabetes mellitus." International Journal of Dermatology **47**: 467-472.
- Chen, Y., Fischbach, M., Belkaid, Y. (2018). "Skin microbiota-host interactions." Nature **553**: 427-436.
- Cheng, C., Hsiao, Y., Ko, J. (2014). "Disseminated deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*." Dermatologica Sinica **32**: 191-192.

- Chung, E., Choi, H, Eun Lim, J, Son, Y (2014). "Development of skin inflammation test model by co-culture of reconstituted 3D skin and RAW264.7 cells." Tissue Engineering and Regenerative Medicine **11**: 87-92.
- Clausen, M., Agner, T. (2016). "Antimicrobial peptides, infections and the skin barrier." Current Problem in Dermatology **49**: 38-46.
- Costin, G., Hearing, V. (2007). "Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress." The FASEB Journal **21**: 976-994.
- Coulibaly, O., Thera, M., Piarroux, R., Doumbo, O., Ranque, S. (2014). "High dermatophyte contamination levels in hairdressing salons of a West African suburban community." Mycoses **58**: 65-68.
- Dale, B. (1990). "Filaggrins." Cellular and Molecular Biology of Intermediate Filaments **Goldman R., Steinert P. (eds)**: 393.
- Dashti, S., Efimova, T., Eckert, R. (2001a). "MEK7-dependent activation of p38 MAP kinase in keratinocytes." Journal of Biological Chemistry **276**: 8059-8063.
- Dashti, S., Efimova, T., Eckert, R. (2001b). "MEK6 regulates human involucrin gene expression via p38 α - and p38 δ -dependent mechanism." Journal of Biological Chemistry **276**: 27214-27220.
- De Hoog, S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., *et al.* (2017a). Mycopathologia **182**: 5-31.
- De Hoog, S., Monod, M., Dawson, T., Boekhout, T., Mayser, P., Gräser, Y. (2017b). "Skin fungi from colonization to infection." Microbiology Spectrum **5**: FUNK-0049-2016.
- de Koning, H., Kamsteeg, M., Rodijk-Olthuis, D., van Vlijmen-Willems, I., van Erp, P., Schalkwijk, J., Zeeuwen, P. (2011). "Epidermal expression of host response genes upon skin barrier disruption in normal skin and uninvolved skin of psoriasis and atopic dermatitis patients." Journal of Investigative Dermatology **131**: 263-266.
- De Vuyst, E., Charlier, C., Giltair, S., De Glas, V., Lambert de Rouvroit, C., Poumay, Y. (2014). "Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter." Methods in Molecular Biology **1195**: 191-201.
- De Vuyst, E., Giltair, S., Lambert de Rouvroit, C., Malaisse, J., Mound, A., Bourtembourg, M., Poumay, Y. (2016a). "Methyl- β -cyclodextrin concurs with interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-25 to induce alterations reminiscent of atopic dermatitis in reconstructed human epidermis." Experimental Dermatology **15**.
- De Vuyst, E., Mound, A., Lambert de Rouvroit, C. Poumay, Y. (2016b). "Modelling atopic dermatitis during the morphogenetic process involved in reconstruction of human epidermis." Current Research in Translational Medicine **64**: 179-183.
- Deacon, J. (2006). "Chapter 3: Fungal structure and ultrastructure." Fungal Biology 4th edition **Blackwell Publishing Ltd (eds)**: 48-66.
- Deacon, J. (2006b). "Chapter 5: Differentiation and development." Fungal Biology 4th edition **Blackwell Publishing Ltd (eds)**: 48-66.
- Deacon, J. (2006c). "Chapter 6: Fungal nutrition." Fungal Biology 4th edition **Blackwell Publishing Ltd (eds)**: 48-66.
- Deacon, J. (2006d). "Chapter 10: Fungal spores, spore dormancy, and spore dispersal." Fungal Biology 4th edition **Blackwell Publishing Ltd (eds)**: 48-66.
- Deacon, J. (2006e). "Chapter 16: "The moulds of man"." Fungal Biology 4th edition **Blackwell Publishing Ltd (eds)**: 48-66.
- Degreef, H. (2008). "Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection)." Mycopathologia **166**: 257-265.
- Descamps, F., Brouta, F., Monod, M., Zaugg, C., Baar, D., Losson, B., Mignon, B. (2002). "Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed *in vivo*." Journal of Investigative Dermatology **119**: 830-835.

- Descamps, F., Brouta, F., Vermout, S., Monod, M., Losson, B., Mignon, B. (2003). "Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5-kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis*." FEMS Immunology and Medical Microbiology **38**: 29-34.
- do Nascimento Pedrosa, T., De Vuyst, E., Mound, A., Lambert de Rouvroit, C., Maria-Engler, S., Poumay, Y. (2017). "Methyl- β -cyclodextrin treatment combined to incubation with interleukin-4 reproduces major features of atopic dermatitis in a 3D-culture model." Archives of Dermatological Research **309**: 63-69.
- Drake, L., Scher, R., Smith, E., Faich, G., Smith, S., Hong, J., Stiller, M. (1998). "Effect of onychomycosis on quality of life." Journal of the American Academy of Dermatology **38**: 702-704.
- Duek, L., Kaufman, G., Ulman, Y., Berdicevsky, I. (2004). "The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections." Journal of Infection **48**: 175-180.
- Eckhard, M., Lengler, A., Liersch, J., Bretzel, R., Mayser, P. (2007). "Fungal foot infections in patients with diabetes mellitus - results of two independent investigations." Mycoses **50**: 14-19.
- Efimova, T., Broome, A., Eckert, R. (2003). "A regulatory role for p38 δ MAPK in keratinocyte differentiation." Journal of Biological Chemistry **278**: 34277-34285.
- Engelhardt, R., Grimbacher, B. (2012). "Medenlian traits causing susceptibility to mucocutaneous fungal infections in human subjects." Journal of Allergy and Clinical Immunology **192**: 294-305.
- Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., Declercq, W. (2013). "Cell death by cornification." Biochimica et Biophysica Acta **1833**: 3471-3480.
- Emmons, C. (1934). "Dermatophytes: natural groupings based on the form of the spores and accessory organs." Archives of Dermatology and Syphilology **30**: 337-362.
- Esquenazi, D., de Souza, W., Sales Alviano, C., Rozental, S. (2003). "The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells." Immunology and Medical Microbiology **35**: 113-123.
- Esquenazi, D., Sales Alviano, C., de Souza, W., Rozental, S. (2004). "The influence of surface carbohydrates during *in vitro* infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*." Research in Microbiology **155**: 144-153.
- Fairley, J., Zivony, D. (2001). "Epidermal kinetics and regulation of cell proliferation." The Biology of the Skin **Freinkel R., Woodley D. (eds)**: 201-207.
- Faway, E., Cambier, L., Mignon, B., Poumay, Y., Lambert de Rouvroit, C. (2017). "Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: a new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents." Medical Mycology **55**: 485-494.
- Ferwerda, B., Ferwerda, G., Plantinga, T., Willment, J., van Spriel, A., Venselaar, H. *et al.* (2009). "Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections." The New England Journal of Medicine **361**: 1760-1767.
- Firat, Y., Simanski, M., Rademacher, F., Schröder, L., Brasch, J., Harder, J. (2014). "Infection of keratinocytes with *Trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression." PLoS ONE **9**: e93941.
- Firon, A., Villalba, F., Beffa, R., d'Enfert, C. (2003). "Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis." Eucaryotic Cell **2**: 247-255.
- Frankart, A., Malaisse, J., De Vuyst, E., Minner, F., Lambert de Rouvroit, C., Poumay, Y. (2012a). "Epidermal morphogenesis during progressive *in vitro* 3D reconstruction at the air-liquid interface." Experimental Dermatology **21**: 871-875.
- Frankart, A., Coquette, A., Schroeder, K-R., Poumay, Y. (2012b). "Studies of cell signaling in a reconstructed human epidermis exposed to sensitizers: IL-8 synthesis and release depend on EGFR activation." Archives of Dermatological Research **304**: 289-303.
- Freinkel, R. (2001). "Control of body temperature." The Biology of the Skin **Freinkel R., Woodley D. (eds)**: 233-237.

- Frew, L., Stock, S. (2011). "Antimicrobial peptides and pregnancy." Society for Reproduction and Fertility **141**: 725-735.
- Fritz, P., Beck-Jendroschek, V., Brasch, J. (2012). "Inhibition of dermatophytes by the antimicrobial peptides human β -defensin-2, ribonuclease 7 and psoriasin." Medical Mycology **50**: 579-584.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Suqitani, Y. *et al.* (2002). "Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice." Journal of Cell Biology **156**: 1099-1111.
- Gallo, R. (2017). "Human skin is the largest epithelial surface for interaction with microbes." Journal of Investigative Dermatology **137**: 1213-1214.
- Ganz, T. (2003). "The role of antimicrobial peptides in innate immunity." Integrative and Comparative Biology **43**: 300-304.
- Garcia-Madrid, L., Huizar-Lopez, M., Flores-Romo, L., Islas-Rodriguez, A. (2011). "*Trichophyton rubrum* manipulates the innate immune functions of human keratinocytes." Central European Journal of Biology **6**: 902-910.
- Garcia-Romero, M., Granados, J., Vega-Memije, M., Arenas, R. (2012). "Analysis of genetic polymorphism of the HLA-B and HLA-DR loci in patients with dermatophytic onychomycosis and in their first-degree relatives." Actas Dermosifiliograficas **103**: 59-62.
- Garcia-Romero, M., Arenas, R. (2015). "New insights into genes, immunity, and the occurrence of dermatophytosis." Journal of Investigative Dermatology **135**: 655-657.
- Garrod, D., Chidgey, M. (2008). "Desmosome structure, composition and function." Biochimica et Biophysica Acta **1778**: 572-587.
- Gentles, J., Evans, E. (1973). "Foot infections in swimming baths." British Medical Journal **3**: 260-262.
- Ghannoum, M., Rice, L. (1999). "Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance." Clinical Microbiology Reviews **12**: 501-517.
- Giddey, K., Favre, B., Quadroni, M., Monod, M. (2007). "Closely related dermatophyte species produce different patterns of secreted proteins." FEMS Microbiology Letters **267**: 95-101.
- Gläser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J. *et al.* (2009). "The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption." Journal of Investigative Dermatology **129**: 641-649.
- Goodenough, D., Paul, D. (2009). "Gap junctions." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **1**: a002576.
- Grando, S., Hostager, B., Herron, M., Dahl, M., Nelson, R. (1992). "Binding of *Trichophyton rubrum* mannan to human monocytes *in vitro*." Journal of Investigative Dermatology **98**: 876-880.
- Grappel, S., Blank, F., Bishop, C. (1969). "Immunological studies on dermatophytes IV. Chemical structures and serological reactivities of polysaccharides from *Microsporum praecox*, *Trichophyton ferrugineum*, *Trichophyton sabouraudii* and *Trichophyton tonsurans*." Journal of Bacteriology **97**: 23-26.
- Gräser, Y., El Fari, M., Vilgalys, R., Kuijpers, A., de Hoog, S., Presber, W. *et al.* (1999). "Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region." Medical Mycology **37**: 105-114.
- Green, C., Cheng, G., Chandra, J., Mukherjee, P., Ghannoum, M., Hoyer, L. (2004). "RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms." Microbiology **150**: 267-275.
- Green, F., Lee, K., Balish, E. (1982). "Chronic *T. mentagrophytes* dermatophytosis of Guinea pig skin grafts on nude mice." Journal of Investigative Dermatology **79**: 125-129.
- Grice, E., Kong, H., Renaud, G., Young, A., Bouffard, G., Blakesley, R. *et al.* (2008). "A diversity profile of the human skin microbiota." Genome Research **18**: 1043-1050.
- Grice, E., Segre, J. (2011). "The skin microbiome." Nature Reviews Microbiology **9**: 244-253.

- Gruber, R., Börnchen, C., Rose, K., Daubmann, A., Volksdorf, T., Wladykowski, E. *et al.* (2015). "Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis." The American Journal of Pathology **185**: 2777-2789.
- Grumbt, M., Defaweux, V., Mignon, B., Monod, M., Burmester, A., Wöstemeyer, J., Staib, P. (2011). "Targeted gene deletion and *in vivo* analysis of putative virulence gene function in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae*." Eukaryotic Cell **10**: 842-853.
- Grumbt, M., Monod, M., Yamada, T., Hertweck, C., Kunert, J., Staib, P. (2013). "Keratin degradation by dermatophytes relies on dioxygenase and a sulfite efflux pump." Journal of Investigative Dermatology **133**: 1550-1555.
- Gupta, A., Konnikov, N., MacDonald, P., Rich, P., Rodger, N., Edmonds, M. *et al.* (1998). "Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicentre survey." British Journal of Dermatology **139**: 665-671.
- Gupta, A., Cooper, E. (2008). "Update in antifungal therapy of dermatophytosis." Mycopathologia **166**: 353-367.
- Gupta, A., Foley, K., Versteeg, S. (2017). "New antifungal agents and new formulations against dermatophytes." Mycopathologia **182**: 127-141.
- Haake, A., Glynis, A., Holbrook, K. (2001). "Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis." The Biology of the Skin **Freinkel R., Woodley D. (eds)**: 19-45.
- Haftak, M., Simon, M., Kanitakis, J., Maréchal, S., Claudy, A., Serre, G., Schmitt, D. (1997). "Expression of corneodesmosin in the granular layer and *stratum corneum* of normal and diseased epidermis." British Journal of Dermatology **137**: 864-873.
- Harder, J., Dressel, S., Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Mrowietz, U. *et al.* (2010). "Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury." Journal of Investigative Dermatology **130**: 1355-1364.
- Hartsock, A., Nelson, J. (2008). "Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton." Biochimica et Biophysica Acta **1778**: 660-669.
- Hashimoto, K. (1971). "Intercellular spaces of the human epidermis as demonstrated with lanthanum." The journal of Investigative Dermatology **57**: 17-31.
- Hashmi, S., Marinkovich, P. (2015). "Biology of the basement membrane zone." Blistering Diseases **Murrell D. (eds)**: 3-20.
- Hattori, F., Kiatsurayanon, C., Okumura, K., Ogawa, H., Ikeda, S., Okamoto, K., Niyonsaba, F. (2014). "The antimicrobial protein S100A7/psoriasin enhances the expression of keratinocyte differentiation markers and strengthens the skin's tight junction barrier." British Journal of Dermatology **171**: 742-753.
- Havlickova, B., Czaika, V., Friedrich, M. (2008). "Epidemiological trends in skin mycoses worldwide." Mycoses **51**: 2-15.
- Hayette, M., Sacheli, R. (2015). "Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach." Current Fungal Infection Reports **9**: 164-179.
- Heddergott, C., Bruns, S., Nietzsche, S., Leonhardt, I., Kurzai, O., Knemeyer, O., Brakhage, A. (2012). "The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells." Eukaryotic Cell **11**: 673-682.
- Heinen, M., Cambier, L., Fievez, L., Mignon, B. (2017). "Are Th17 cells playing a role in immunity to dermatophytosis?" Mycopathologia **182**: 251-261.
- Hollox, E., Armour, J., Barber, J. (2003). "Extensive normal copy number variation of a β -defensin antimicrobial-gene cluster." American Journal of Human Genetics **73**: 591-600.
- Hollox, E., Huffmeier, U., Zeeuwen, P., Palla, R., Lascorz, J., Rodijk-Olthuis, D. *et al.* (2008). "Psoriasis is associated with increased beta-defensin genomic copy number." Nature Genetics **40**: 23-25.
- Ikuta, K., Shibata, N., Blake, J., Dahl, M., Nelson, R., Hisamichi, K. *et al.* (1997). "NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*." Biochemical Journal **323**: 297-305.

- Ishida-Yamamoto, A., Igawa, S. (2015). "The biology and regulation of corneodesmosomes." Cell and Tissue Research **360**: 477-482.
- Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K. *et al.* (2010). "Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization." Nature **465**: 346-349.
- Izadpanah, A., Gallo, R. (2005). "Antimicrobial peptides." Journal of American Academy of Dermatology **52**: 381-390.
- Jannasch, M., Groeber, F., Brattig, N., Unger, C., Walles, H., Hansmann, J. (2015). "Development and application of three-dimensional skin equivalents for the investigation of percutaneous worm invasion." Experimental Parasitology **150**: 22-30.
- Jans, R., Atanasova, G., Jadot, M., Poumay, Y. (2004). "Cholesterol depletion upregulates involucrine expression in epidermal keratinocytes through activation of p38." Journal of Investigative Dermatology **123** : 564-573.
- Jaradat, S., Hoder-Przyrembel, C., Cubillos, S., Krieg, N., Lehmann, K., Piehler, S. *et al.* (2013). "Beta-defensin-2 genomic copy number variation and chronic periodontitis." Journal of Dental Research **92**: 1035-1040.
- Jaradat, S., Cubillos, S., Krieg, N., Lehmann, K., Issa, B., Piehler, S. *et al.* (2015). "Low DEFB4 copy number and high systemic hBD-2 and IL-22 levels are associated with dermatophytosis." Journal of Investigative Dermatology **135**: 750-758.
- Jensen, J., Pfeiffer, S., Akaki, T., Schröder, J., Kleine, M., Neumann, C. *et al.* (2007). "Barrier function, epidermal differentiation, and human β -defensin 2 expression in tinea corporis." Journal of Investigative Dermatology **127**: 1720-1727.
- Jiang, D., Zhy, W., Wang, Y., Sun, C., Zhang, K., Yang, J. (2013). "Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies." Biotechnology Advances **31**: 1562-1574.
- Jiang, Y., Wang, Y., Wang, B., Yang, D., Yu, K., Yang, X. *et al.* (2010). "Antifungal activity of recombinant mouse beta-defensin 3." The Society for Applied Microbiology **50**: 468-473.
- Joffre, O., Nolte, M., Spörri, R., Reis e Sousa, C. (2009). "Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity." Immunological Reviews **227**: 234-247.
- Jonca, N., Guerrin, M., Hadjiolova, K., Caubet, C., Gallinaro, H., Simon, M., Serre, G. (2002). "Corneodesmosin, a component of epidermal corneocyte desmosomes, displays homophilic adhesive properties." The Journal of Biological Chemistry **277**: 5024-5029.
- Jonca, N., Leclerc, E., Caubet, C., Simon, M., Guerrin, M., Serre, G. (2011). "Corneodesmosomes and corneodesmosin: from the *stratum corneum* cohesion to the pathophysiology of genodermatoses." European Journal of Dermatology **21**: 35-42.
- Jousson, O., Léchenne, B., Bontems, O., Mignon, B., Reichard, U., Barblan, J. *et al.* (2004). "Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*." Genetics and Molecular Biology **339**: 79-88.
- Kamihama, T., Kimura, T., Hosokawa, J., Ueji, M., Takase, T., Tagami, K. (1997). "Tinea pedis outbreak in swimming pools in Japan." Public Health **111**: 249-253.
- Kanemaru, K., Nakamura, Y., Totoki, K., Fukuyama, T., Shoji, M., Kaneko, H. *et al.* (2017). "Phospholipase C δ 1 regulates p38 MAPK activity and skin barrier integrity." Cell Death and Differentiation **24**: 1079-1090.
- Kaufman, G., Horwitz, B., Duek, L., Ullman, Y., Berdicevsky, I. (2007). "Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes." Medical Mycology **45**: 149-155.
- Kawasaki, T., Kawai, T. (2014). "Toll-like receptor signaling pathways." Frontiers in Immunology **5**: 461.
- Kennedy, E., Connolly, J., Hourihane, J., Fallon, P., McLean, I., Murray, D. *et al.* (2017). "Skin microbiome before development of atopic dermatitis: Early colonization with commensal staphylococci at 2 months is associated with a lower risk of atopic dermatitis at 1 year." Journal of Allergy and Clinical Immunology **139**: 166-172.

- Kiatsurayanon, C., Niyonsaba, F., Smithrithee, R., Akiyama, T., Ushio, H., Hara, M. *et al.* (2014). "Host defense (antimicrobial) peptide, human β -defensin-3, improves the function of the epithelial tight-junction barrier in human keratinocytes." Journal of Investigative Dermatology **134**: 2163-2173.
- King, R., Khan, H, Foye, J, Greenberg, J, Jones, H (1975). "Transferrin, iron, and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin." Journal of Laboratory and Clinical Medicine **86**: 204-212.
- Kirschner, N., Poetzel, C., von den Drieschn P., Wladykowski, E., Moll, I., Behne, M., Brandner, J. (2009). "Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines." The American Journal of Pathology **175**: 1095-1106.
- Kirschner, N., Houdek, P., Fromm, M., Moll, I., Brandner, J. (2010). "Tight junctions form a barrier in human epidermis." European Journal of Cell Biology **89**: 839-842.
- Kirschner, N., Rosenthal, R., Furuse, M., Moll, I., Fromm, M., Brandner, J. (2013). "Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes." Journal of Investigative Dermatology **133**: 1161-1169.
- Kligman, A., Grinsberg, D. (1950). "Immunity of the adult scalp to infection with *Microsporum audouinii*." Journal of Investigative Dermatology **14**: 345-358.
- Klis, F., Ram, A, De Groot, P (2007). "A molecular and genomic view of the fungal cell wall." Biology of the Fungal Cell **8**: 97-120.
- Koga, T., Ishizaki, H., Matsumoto, T., Hori, Y. (1993). "Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in a dermatophytosis patient in response to stimulation with *trichophyton*." The Journal of Dermatology **20**: 441-443.
- Koga, T., Shimizu, A., Nakayama, J. (2001). "Interferon-gamma production in peripheral lymphocytes of patients with tinea pedis: comparison of patients with and without tinea unguinum." Medical Mycology **39**: 87-90.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. (2009). "IL-17 and Th17 cells." Annual Review of Immunology **27**: 485-517.
- Kowalczyk, A., Green, K. (2013). "Structure, function and regulation of desmosomes." Progress in Molecular Biology and Translational Science **116**: 95-118.
- Krishnakumari, V., Rangaraj, N., Nagaraj, R. (2009). "Antifungal activities of human beta-defensins HBD-1 to HBD-3 and their C-terminal analogs Phd1 to Phd3." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**: 256-260.
- Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., Amagai, M. (2009). "External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers." Journal of Experimental Medicine **206**: 2937-2946.
- Kunert, J. (1972). "Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the sulphotolysis of the protein." Experientia **28**: 1025-1026.
- Kuroda, S., Kurasawa, M., Mizukoshi, K., Maeda, T., Yamamoto, T., Oba, A. *et al.* (2010). "Perturbation of lamellar granule secretion by sodium caprate implicates epidermal tight junctions in lamellar granule function." Journal of Dermatological Science **59**: 107-114.
- Kusek, M., Pazos, M., Pirzai, W., Hurler, B. (2014). "*In vitro* coculture assay to assess pathogen induced neutrophil trans-epithelial migration." Journal of Visualized Experiments **83**: e50823
- Lacroix, C., Baspeyras, M., de La Salmonière, P., Benderdouche, M., Couprie, B., Accoceberry, I. *et al.* (2002). "Tinea pedis in European marathon runners." European academy of Dermatology and Venereology **16**: 139-142.
- Lai, Y., Cogen, A., Radek, K., Park, H., MacLeod, D., Leichtle, A. *et al.* (2010). "Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections." The journal of Investigative Dermatology **130**: 2211-2221.
- Lambert de Rouvroit, C., Charlier, C., Lederer, D., De Glas, V., De Vuyst, E., Dargent, J. *et al.* (2013). "*In vitro* reconstruction of epidermis from primary Darier's disease keratinocytes replicates the histopathological phenotype." Journal of Dermatological Science **71**: 138-152.

- Lanternier, F., Pathan, S., Vincent, Q., Liu, L., Cypowyj, S., Prando, C. *et al.* (2013). "Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency." The New England Journal of Medicine **369**: 1704-1714.
- Latgé, J. (2007). "The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell." Molecular Microbiology **66**: 279-290.
- Lechenne, B., Reichard, U., Zaugg, C., Fratti, M., Kunert, J., Boulat, O., Monod, M. (2007). "Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes." Microbiology **153**: 905-913.
- Leclerc, E., Huchencq, A., Mattiuzzo, N., Metzger, D., Chambon, P., Ghyselinck, N. *et al.* (2009). "Corneodesmosin gene ablation induces lethal skin-barrier disruption and hair-follicle degeneration related to desmosome dysfunction." Journal of Cell Science **122**: 2699-2709.
- Lee, W., Kim, S., Jang, Y., Lee, S., Kim, D., Bang, Y., Jun, J. (2015). "Increasing prevalence of *Trichophyton rubrum* identified through an analysis of 115,846 cases over the last 37 years." The Korean Academy of Medical Sciences **30**: 639-643.
- Lemsaddek, A., Chambel, L., Tenreiro, R. (2010). "Incidence of fungalsin and subtilisin virulence genes in dermatophytes." Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. Méndez-Vilas (eds): 658-665.
- Leng, W., Liu, T., Wang, J., Li, R., Jin, Q. (2009). "Expression dynamics of secreted protease genes in *Trichophyton rubrum* induced by key host's proteinaceous components." Medical Mycology **47**: 759-765.
- Liang, P., Huang, X., Yi, J., Chen, Z., Ma, H., Ye, C. *et al.* (2016). "A *Trichophyton rubrum* infection model based on the reconstructed human epidermis - Episkin." Chinese Medical Journal **129**: 54-58.
- Liu, T., Zhang, Q., Wang, L., Yu, L., Leng, W., Yang, J. *et al.* (2007). "The use of global transcriptional analysis to reveal the biological and cellular events involved in distinct development phases of *Trichophyton rubrum* conidial germination." BMC Genomics **8**: 100.
- Lopez-Berges, M., Di Pietro, A., Daboussi, M., Wahab, H., Vasnier, C., Roncero, M. *et al.* (2009). "Identification of virulence genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* by large-scale transposon tagging." Molecular Plant Pathology **10**: 95-107.
- Lopez-Garcia, B., Lee, P., Gallo, R. (2006). "Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and tinea versicolor." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **57**: 877-882.
- Lund, A., DeBroer, D (2008). "Immunoprophylaxis of dermatophytosis in animals." Mycopathologia **166**: 407-424.
- Lundström, A., Egelrud, T. (1988). "Cell shedding from human plantar skin *in vitro*: evidence of its dependence on endogenous proteolysis." Journal of Investigative Dermatology **91**: 340-343.
- Lundström, A., Serre, G., Haftk, M., Egelrud, T. (1990). "Evidence that cell shedding from plantar *stratum corneum in vitro* involves endogenous proteolysis of the desmosomal protein desmoglein I." Journal of Investigative Dermatology **94**: 216-220.
- Lundström, A., Serre, G., Haftk, M., Egelrud, T. (1994). "Evidence for a role of corneodesmosin, a protein which may serve to modify desmosomes during cornification, in *stratum corneum* cell cohesion and desquamation." Archives of Dermatological Research **286**: 369-375.
- Maksimovic, S., Nakatani, M., Baba, Y., Nelson, A., Marshall, K., Wellnitz, S. *et al.* (2014). "Epidermal Merkel cells are mechanosensory cells that tune mammalian touch receptors." Nature **509**: 617-621.
- Malaisse, J., Bourguignon, V., De Vuyst, E., Lambert de Rouvroit, C., Nikkels, A., Flamion, B., Poumay, Y. (2014). "Hyaluronan metabolism in human keratinocytes and atopic dermatitis skin is driven by a balance of hyaluronan synthases 1 and 3." Journal of Investigative Dermatology **134**: 2174-2182.
- Martinez-Rossi, N., Peres, N., Rossi, A. (2017). "Pathogenesis of dermatophytosis: sensing the host tissue." Mycopathologia **182**: 215-227.
- Masunaga, T. (2006). "Epidermal basement membrane: its molecular organization and blistering disorders." Connective Tissue Research **47**: 55-66.

- Mathy, A., Baldo, A., Schoofs, L., Cambier, L., Defaweux, V., Tabart, J. *et al.* (2010). "Fungalysin and dipeptidyl-peptidase gene transcription in *Microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats." Veterinary Microbiology **146**: 179-182.
- McGinnis, M. R., Tying, S K (1996). "Introduction to mycology." Medical Microbiology 4th edition **Baron S. (eds)**
- McGregor, J., Hamilton, A., Hay, R. (1992). "Possible mechanisms of immune modulation in chronic dermatophytoses: an *in vitro* study." British Journal of Dermatology **127**: 233-238.
- Méhul, B., Gu, Z., Jomard, A., Laffet, G., Feuilhade, M., Monod, M. (2016). "Sub6 (Tri r 2), an onychomycosis marker revealed by proteomics analysis of *Trichophyton rubrum* secreted proteins in patient nail samples." Journal of Investigative Dermatology **136**: 331-333.
- Meng, W., Takeichi, M. (2009). "Adherens junction: molecular architecture and regulation." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology **1**: a002899.
- Menon, G., Cleary, G., Lane, M. (2012). "The structure and function of the *stratum corneum*." International Journal of Pharmaceutics **435**: 3-9.
- Mese, G., Richard, G., White, T. (2007). "Gap junctions: basic structure and function." Journal of Investigative Dermatology **127**: 2516-2524.
- Metin, B., Heitman, J. (2017). "Sexual reproduction in dermatophytes." Mycopathologia **182**: 45-55.
- Micali, G., Lacarrubba, F., Bongu, A., West, D. (2001). "The skin barrier." The Biology of the Skin **Freinkel R., Woodley D. (eds)** :219-231.
- Michaels, A., Chandrasekaran, S., Shaw, J. (1975). "Drug penetration through human skin: theory and *in vitro* experimental measurement." AIChE Journal **21**: 985-996.
- Mignon, B., Swinnen, M., Bouchara, J., Hofinger, M., Nikkels, A., Pierard, G. *et al.* (1998). "Purification and characterization of a 315 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats." Medical Mycology **36**: 395-404.
- Mignon, B., Tabart, J., Baldo, A., Mathy, A., Losson, B., Vermout, S. (2008). "Immunization and dermatophytosis." Current Opinion in Infectious Disease **21**: 134-140.
- MILLS, Stacey E. (2012). Histology for Pathologists **Lippincott Williams & Wilkins (eds)**; Fourth Edition: 1328 p.
- Mishra, N. (2007). "Fungal cells." Encyclopedia of Life Sciences **John Wiley & Sons (eds)**.
- Miyata, T., Fujimura, T. Masuzawa, M., Katsuoka, K., Nishiyama, S. (1996). "Local expression of IFN- γ mRNA in skin lesions of patients with dermatophytosis." Journal of Dermatological Science **13**: 167-171.
- Monod, M., Léchenne, B., Jousson, O., Grand, D., Zaugg, C., Stöcklin, R., Grouzmann, E. (2005). "Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*." Microbiology **151**: 145-155.
- Monod M. (2017). "Récente révision des espèces des dermatophytes et de leur nomenclature." Revue Médicale Suisse **13** :1-5.
- Monod, M. (2008). "Secreted proteases from dermatophytes." Mycopathologia **166**: 285-294.
- Muhsin, T., Aubaid, A., Al-Duboon, A. (1997). "Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media." Mycoses **40**: 465-469.
- Mukherjee, P., Leidich, S., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N., Ghannoum, M. (2003). "Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **47**: 82-86.
- Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M., Salcedo, R., Kastenmuller, W. *et al.* (2012). "Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals." Science **337**: 1115-1119.
- Nakamura, Y., Kano, R., Hasegawa, A., Watanabe, S. (2002). "Interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology **9**: 935-937.

- Nakamura, Y., Nishibu, A., Yasoshima, M., Tanoue, C., Yoshida, N., Hatta, J. *et al.* (2012). "Analysis of *Trichophyton* antigen-induced contact hypersensitivity in mouse." Journal of Dermatological Science **66**: 144-153.
- Nakatsuji, T., Kao, M., Zhang, L., Zouboulis, C., Gallo, R., Huang, C. (2010). "Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating β -defensin-2 expression." The journal of Investigative Dermatology **130**: 985-994.
- Nenoff, P., Krüger, C., Ginter-Hanselmayer, G., Tietz, H. (2014a). "Mycology - an update. Part 1: dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis." Journal of the German Society of Dermatology **1610**-0379/2014/1203: 188-205.
- Nenoff, P., Krüger, C., Ginter-Hanselmayer, G., Schulte-Beerbühl, R., Tietz, H. (2014b). "Mycology - an update part 2: dermatomycoses: clinical picture and diagnosis." Journal of the German Society of Dermatology **12**: 749-777.
- Netea, M., Brown, G., Kullberg, B., Gow, N. (2008). "An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system." Nature Reviews Microbiology **6**: 67-78.
- Nievers, M., Schaapveld, R., Sonnenberg, A. (1999). "Biology and function of hemidesmosomes." Matrix Biology **18**: 5-17.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nakano, N., Ng, W., Sayama, K., Hishimoto, K. *et al.* (2007). "Antimicrobial peptides human β -defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of pro-inflammatory cytokines and chemokines." Journal of Investigative Dermatology **127**: 594-604.
- Oh, H., Siano, B., Diamond, S. (2008). "Neutrophil isolation protocol." Journal of Visualized Experiments **17**: 745.
- Ohnemus, U., Kohrmeyer, K., Houdek, P., Rohde, H., Wladykowski, E., Vidal, S. *et al.* (2008). "Regulation of epidermal tight-junctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative *Staphylococcus* strains." Journal of Investigative Dermatology **128**: 906-916.
- Oren, A., Ganz, T., Liu, L., Meerloo, T. (2003). "In human epidermis, β -defensin 2 is packaged in lamellar bodies." Experimental and Molecular Pathology **74**: 180-182.
- Osborne, C., Leitner, I., Favre, B., Ryder, N. (2005). "Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **49**: 2840-2844.
- Paulino, L., Tseng, C., Blaser, M. (2008). "Analysis of *Malassezia* microbiota in healthy superficial human skin and in psoriatic lesions by multiplex real-time PCR." FEMS Yeast Research **8**: 460-471.
- Pérez, P., Ribas, J. (2013). "Fungal cell wall analysis." Laboratory Protocols in Fungal Biology **V.K. Gupta (eds)**: 175-196.
- Polonelli, L., Casadevall, A., Han, Y., Bernardis, F., Kirkland, T., Matthews, R. *et al.* (2000). "The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections." Medical Mycology **38**: 281-292.
- Poumay, Y., Dupont, F., Marcoux, S., Leclercq-Smekens, M., Hérin, M., Coquette, A. (2004). "A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in *in vitro* studies." Archives of Dermatological Research **296**: 203-211.
- Prescott, S., Larcombe, D., Logan, A., West, C., Burks, W., Caraballo, L. *et al.* (2017). "The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming." World Allergy Organization Journal **10**: 29.
- Proksch, E., Brandner, J., Jensen, J. (2008). "The skin: an indispensable barrier." Experimental Dermatology **17**: 1063-1072.
- Raschi, E., Poluzzi, E., Koci, A., Caraceni, P., De Ponti, F. (2014). "Assessing liver injury associated with antimycotics: Concise literature review and clues from data mining of the FAERS database." World Journal of Hepatology **6**: 601-612.
- Rashid, A., Edward, M., Richardson, M. (1995). "Activity of terbinafine on *Trichophyton mentagrophytes* in human living skin equivalent model." Journal of Medical & Veterinary Mycology **33**: 229-233.

- Rashid, A. (2001). "Arthroconidia as vectors of dermatophytosis." *Cutis* **67**: 23.
- Romani, L. (2011). "Immunity to fungal infections." *Nature Reviews Immunology* **11**: 275-288.
- Ross, I. K. (2001). "Fungal cell walls." *Encyclopedia of Life Sciences John Wiley & Sons (eds)*.
- Rothman, S., Smiljanic, A., Weitkamp, A. (1946). "Mechanism of spontaneous cure in puberty of ringworm of the scalp." *Science* **104**: 201-203.
- Sabouraud, R. (1910). "Les teignes." **Paris : Masson (eds)**.
- Saijo, S., Yamabe, K., Kakuta, S., Ishigame, H., Akitsu, A., Fujikado, N. *et al.* (2010). "Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*." *Immunity* **32**: 681-691.
- Saijo, S., Iwakura, Y. (2011). "Dectin-1 and dectin-2 in innate immunity against fungi." *International Immunology* **23**: 467-472.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. (2009). "Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease." *Journal of Cell Science* **122**: 1285-1294.
- Sanford, J., Gallo, R. (2014). "Functions of the skin microbiota in health and disease." *Seminars in Immunology* **25**: 370-377.
- Sass, V., Schneider, T., Wilmes, M., Korner, C., Tossi, A., Novikova, N. *et al.* (2010). "Human beta-defensin 3 inhibits cell wall biosynthesis in staphylococci." *Infection and Immunity* **78**: 2793-2800.
- Sato, K., Yang, X., Yudate, T., Chung, J., Wu, J., Luby-Phelps, K. *et al.* (2006). "Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor chain to induce innate immune responses." *Journal of Biological Chemistry* **281**: 38854-38866.
- Saunte, D., Holgersen, J., Haedersdal, M., Strauss, G., Bitsch, M., Svendsen, O. *et al.* (2006). "Prevalence of toe nail onychomycosis in diabetic patients." *Acta Dermato-Venereologica* **86**: 425-428.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T., Stange, E., Fellermann, K. (2007). "Induction of human β -defensin 2 by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin." *Infection and Immunity* **75**: 2399-2407.
- Schröder, J., Harder, J. (2006). "Antimicrobial skin peptides and proteins." *Cellular and Molecular Life Science* **63**: 469-486.
- Seebacher, C., Bouchara, J-P., Mignon, B. (2008). "Updates on the epidemiology of dermatophyte infections." *Mycopathologia* **166**: 335-352.
- Semple, F., Dorin, J. (2012). " β -defensins: multifunctional modulators of infection, inflammation and more?" *Journal of Innate Immunology* **4**: 337-348.
- Shiraki, Y., Ishibashi, Y., Hiruma, M., Nishikawa, A., Ikeda, S. (2006). "Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections." *Journal of Medical Microbiology* **55**: 1175-1185.
- Simon, M., Montézin, M., Guerrin, M., Durieux, J., Serre, G. (1997). "Characterization and purification of human corneodesmosin, an epidermal basic glycoprotein associated with corneocyte-specific modified desmosomes." *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 31770-31776.
- Simon, M., Jonca, N., Guerrin, M., Haftek, M., Bernard, D., Caubet, C. *et al.* (2001). "Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation." *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 20292-20299.
- Smith, K. J., Neafie, R C, Skelton, H G, Barrett, T L, Graham, J H, Lupton, G P (1991). "Majocchi's granuloma." *Cutaneous Pathology* **18**: 28-35.
- Smith, K., Welsh, M., Skelton, H (2001). "*Trichophyton rubrum* showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients." *British Journal of Dermatology* **145**: 344-348.
- Spencer, J., Schwaderer, A., Wang, H., Bartz, J., Kline, J., Eichler, T. *et al.* (2013). "Ribonuclease 7, an antimicrobial peptide upregulated during infection, contributes to microbial defense of the human urinary tract." *Kidney International* **83**: 615-625.

- Squeo, R., Beer, R., Silvers, D., Weitzman, I., Grossman, M. (1998). "Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host." Journal of the American Academy of Dermatology **39**: 379-380.
- Sriranganadane, D., Waridel, P., Salamin, K., Feuermann, M., Mignon, B., Staib, P. *et al.* (2011). "Identification of novel secreted proteases during extracellular proteolysis by dermatophytes at acidic pH." Proteomics **11**: 4422-4433.
- Streilein, J., Bergstresser, P. (1984). "Langerhans cells: antigen presenting cells of the epidermis." Immunobiology **168**: 285-300.
- Sugawara, T., Iwamoto, N., Akachi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., Sugai, M., Furuse, M. (2013). "Tight junction dysfunction in the *stratum granulosum* leads to aberrant *stratum corneum* barrier function in claudin-1 deficient mice." Journal of Dermatological Science **70**: 12-18.
- Szepietowski, J., Reich, A. (2009). "Stigmatisation in onychomycosis patients: a population-based study." Mycoses **52**: 343-349.
- Tabart, J., Baldo, A., Vermout, S., Nusgens, B., Lapiere, C., Losson, B., Mignon, B. (2007). "Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporum canis* dermatophytosis." Journal of Medical Microbiology **56**: 971-975.
- Tabart J. (2008a) Contribution à l'étude du rôle des cellules épidermiques dans la mise en place de la réponse immune anti-*Microsporum canis*. Thèse de doctorat sous la supervision du Prof. Bernard Mignon. **Laboratoire de Mycologie Médicale**, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège ; 172 p.
- Tabart, J., Baldo, A., Vermout, S., Losson, B., Mignon, B. (2008b). "Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for the screening of antifungal drugs against *Microsporum canis*." Veterinary Dermatology **19**: 130-133.
- Takehara, K., Oe, M., Tsunemi, Y., Nagase, T., Ohashi, Y., Iizaka, S. *et al.* (2011). "Factors associated with presence and severity of toenail onychomycosis in patients with diabetes: a cross-sectional study." International Journal of Nursing Studies **48**: 1101-1108.
- Tani, K., Adachi, M., Nakamura, Y., Kano, R., Makimura, K., Hasegawa, A. *et al.* (2007). "The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes." Archives in Dermatological Research **299**: 381-387.
- Tatsumi, Y., Nagashima, M., Shibunushi, T., Iwata, A., Kangawa, Y., Inui, F. *et al.* (2013). "Mechanism of action of efinaconazole, a novel triazole antifungal agent." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **57**: 2405-2409.
- Taylor, P., Tsoni, V., Willment, J., Dennehy, K., Rosas, M., Findon, H. *et al.* (2007). "Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection." Nature Immunology **8**: 31-38.
- Teixeira de Aguiar Peres, N., Albuquerque Maranhao, F., Rossi, A., Martinez-Rossi, N. (2010). "Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance." Anais Brasileiros de Dermatologia **85**: 657-667.
- Teixeira de Aguiar Peres, N., Gomes da Silva, L., da Silva Santos, R., Jacob, T., Persinoti, G., Rocha, L. *et al.* (2016). "*In vitro* and *ex vivo* infection models help assess the molecular aspects of the interaction of *Trichophyton rubrum* with the host milieu." Medical Mycology **54**: 420-427.
- Tran, V., De Coi, N., Feuermann, M., Schmid-Siegert, E., Bagut, T., Mignon, B. *et al.* (2016). "RNA sequencing-based genome reannotation of the dermatophyte *Arthroderma benhamiae* and characterization of its secretome and whole gene expression profile during infection." mSystems **1**: e00036-16.
- Urban, C., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W. *et al.* (2009). "Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*." PLoS Pathogens **5**: e1000639.
- Van de Veerdonk, F., Kullberg, B., Van der Meer, J., Gow, N., Netea, M. (2008). "Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens." Current Opinion in Microbiology **11**: 305-312.

- Van de Veerdonk, F., Marijnissen, R., Kullberg, B., Koenen, H., Cheng, S., Joosten, I. *et al.* (2009). "The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*." Cell Host Microbe **5**: 329-340.
- Van Itallie, C., Anderson, J. (2006). "Claudins and epithelial paracellular transport." Annual Review of Physiology **68**: 403-429.
- Van Keymeulen, A., Mascré, G., Youseff, K., Harel, I., Michaux, C., De Geest, N. *et al.* (2009). "Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis." Journal of Cell Biology **187**: 91-100.
- Van Smeden, J., Bouwstra, J. (2016). "*Stratum corneum* lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients." Current Problem in Dermatology **49**: 8-26.
- Vermout, S., Tabart, J., Baldo, A., Monod, M., Losson, B., Mignon, B. (2007). "RNA silencing in the dermatophyte *Microsporum canis*." Federation of European Microbiological Societies **275**: 38-45.
- Vermout, S., Baldo, A., Tabart, J., Losson, B., Mignon, B. (2008). "Secreted dipeptidyl peptidases as potential virulence factors for *Microsporum canis*." FEMS Immunology and Medical Microbiology **54**: 299-308.
- Verstrepen, K., Klis, F. (2006). "Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts." Molecular Microbiology **60**: 5-15.
- Volpe, E., Servant, N., Zollinger, R., Bofiatzi, S., Hupe, P., Barillot, E., Soumelis, V. (2008). "A critical function for transforming growth factor- β , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human Th17 responses." Nature Immunology **9**: 650-657.
- Vora, P., Youdim, A., Thomas, L., Fukata, M., Tefay, S., Lukasek, K. *et al.* (2004). " β -defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells." The Journal of Immunology **173**: 5398-5405.
- Wagner, D., Sohnle, P. (1995). "Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts." Clinical Microbiology Reviews **8**: 317-335.
- Watanabe, K., Taniguchi, H., Katoh, T. (2000). "Adhesion of dermatophytes to healthy feet and its simple treatment." Mycoses **43**: 45-50.
- Weitzman, I., Summerbell, R. (1995). "The dermatophytes." Clinical Microbiology Reviews **8**: 240-259.
- Wertz, P. W. (2009). "Human synthetic sebum formulation and stability under conditions of use and storage." International Journal of Cosmetic Science **31**: 21-25.
- Wilson, N., Boniface, K., Chan, J., McKenzie, B., Blumenschein, W., Mattson, J. *et al.* (2007). "Development cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." Nature Immunology **8**: 950-957.
- Wolff, K., Hönigsmann, H. (1971). "Permeability of the epidermis and the phagocytic activity of keratinocytes: ultrastructural studies with thorostrast as a marker." Journal of Ultrastructure Research **36**: 176-190.
- Woodfolk, J., Wheatley, L., Piyasena, R., Benjamin, D., Platts-Mills, T. (1998). "*Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity." Journal of Biological Chemistry **273**: 29489-29496.
- Ya-Xian, Z., Suetake, T., Tagami, H. (1999). "Number of cell layers of the *stratum corneum* in normal skin-relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters." Archives of Dermatological Research **291**: 555-559.
- Yamada, T., Makimura, K., Hisajima, T., Ishihara, Y., Umeda, Y., Abe, S (2009). "Enhanced gene replacements in Ku80 disruption mutants of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*." FEMS Microbiology Letters **298**: 208-217.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S., Chen, Q., Buffo, M., Shogan, J. *et al.* (1999). " β -defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6." Science **286**: 525-528.

- Yoshida, K., Yokouchi, M., Nagao, K., Ishii, K., Amagai, M., Kubo, A. (2013). "Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the *stratum granulosum* of human epidermis." Journal of Dermatological Science **71**: 89-99.
- Yoshikawa, F., Ferreira, L., de Almeida, S. (2015). "IL-1 signaling inhibits *Trichophyton rubrum* conidia development and modulates the IL-17 response *in vivo*." Virulence **6**: 449-457.
- Yoshikawa, F., de Almeida, S. (2017a). "The role of phagocytes and NETs in dermatophytosis." Mycopathologia **182**: 263-272.
- Yoshikawa, F., Ferreira, L., de Almeida, F., de Almeida, S. (2017b). "An *in vitro* model for the study of macrophage response upon *Trichophyton rubrum* challenge." Mycopathologia **182**: 241-250.
- Yuzhakova, D., Shirmanova, M., Bocharov, A., Astrakhantseva, I., Vasilenko, E., Gorshkova, E. *et al.* (2016). "Microbiota induces expression of tumor necrosis factor in postnatal mouse skin." Biochemistry **81**: 1303-1308.
- Zaias, N., Tosti, A., Rebell, G., Morelli, R., Bardazzi, F., Bielek, H. *et al.* (1996). "Autosomal dominant pattern of distal subungual onychomycosis caused by *Trichophyton rubrum*." Journal of American Academy of Dermatology **34**: 302-304.
- Zaitz, C., Campbell, I., Moraes, J., Moraes, M., Gouvea, C., Romero, M. *et al.* (1996). "HLA-associated susceptibility to chronic onychomycosis in brazilian Ashkenazic jews." International Journal of Dermatology **35**: 681-682.
- Zeeuwen, P., Kleerebezem, M., Timmerman, H., Schalkwijk, J. (2013). "Microbiome and skin disease." Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology **13**: 514-520.
- Zhan, P., Liu, W. (2017). "The changing face of dermatophytic infections worldwide." Mycopathologia **182**: 77-86.
- Zhou, L., Lopes, J., Chong, M., Ivanov, R., Victoria, G., Shen, Y. *et al.* (2008). "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function." Nature **453**: 236-240.
- Zurita, J., Hay, R. (1987). "Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes *in vitro*." The Journal of Investigative Dermatology **89**: 529-534.

ANNEXES

**Subvention accordée par la Région wallonne dans le
cadre d'un programme de recherche
d'intérêt général**

*Développement d'un produit pour la prévention des
dermatophytoses au moyen d'inhibiteurs spécifiques des
protéases fongiques*

MYCAVERT

**Contribution du Laboratoire Cellules et Tissus au
rapport scientifique final**

Période du 01/02/2014 au 31/07/2017

Numéro de convention

1318058

Partenaires

Laboratoire de Mycologie Vétérinaire, Université de Liège

- Pr. Bernard Mignon
- Dr. Ludivine Cambier
- Dr. Julie Vignisse

Laboratoire de Technologies Pharmaceutiques et Biopharmacie, Université de Liège

- Pr. Brigitte Evrard
- Dr. Géraldine Piel
- Charline Defourny

Laboratoire Cellules et Tissus, Université de Namur

- Pr. Yves Poumay
- Dr. Catherine Lambert de Rouvroit
- Emilie Faway

Laboratoire de Macromolécules biologiques, Université de Liège

- Pr. Moreno Galleni
- Dr. Astrid Freichels

Service de dermatologie, CHU, Université de Liège

- Pr. Arjen Nikkels

I. Résumé

Les dermatophytoses, causées principalement par *Trichophyton rubrum* et des dermatophytes zoophiles tels *Microsporum canis*, sont des mycoses cutanées superficielles fréquentes, surtout chez certains individus fragilisés médicalement ou socialement. Les traitements sont exclusivement curatifs et potentiellement toxiques pour le patient et l'environnement. Le projet vise au développement d'un produit dermatologique préventif, sans effet délétère, contenant un peptide capable d'inhiber l'adhérence des spores fongiques à la peau, via l'inhibition d'une protéase fongique, la protéase de type subtilisine (Sub) 3, impliquée dans cette étape pathogénique. Il a été précédemment démontré que le propeptide de Sub 3 de *M. canis* est un puissant inhibiteur de l'activité de la protéase mais est dégradé par les arthrospores fongiques. L'objectif spécifique de ce projet est tout d'abord de développer un peptide stable à partir du propeptide qui empêche l'adhérence des dermatophytes à la peau humaine. Ce peptide doit ensuite être inclus dans une formulation galénique adaptée à un usage cutané et des tests de toxicité et d'efficacité du produit doivent être réalisés *in vitro* et *in vivo*.

Les recherches menées ont permis le développement de plusieurs peptides inhibant l'activité de Sub 3 de *T. rubrum* et de *M. canis* :

- Un peptide de 10 acides aminés (peptide "VIP")
- le propeptide de Sub 3 de *M. canis* en fusion avec la thiorédoxine (thiorédoxine-propeptide)
- le propeptide de Sub 3 de *M. canis* couplé à la protéine HIS-Tag
- le propeptide de Sub 3 de *T. rubrum* en fusion avec la thiorédoxine (thiorédoxine-propeptide)
- le propeptide de Sub 3 de *T. rubrum* couplé à la protéine HIS-Tag
- le peptide 2d issu du propeptide de Sub3 de *M. canis*
- un peptide de 13 acides aminés issus du phage display

Ces peptides inhibiteurs ont été testés pour leur stabilité face aux arthrospores fongiques et après incubation sur épiderme humain reconstruit (RHE), leur absence de toxicité sur l'épiderme et leur efficacité à empêcher l'adhérence des dermatophytes à la peau. Des épidermes humains reconstruits et des explants cutanés issus d'oreilles de cochon ont été utilisés pour les tests *in vitro* réalisés avec les peptides.

La majorité des peptides se sont avérés stables en présence des arthrospores fongiques et des RHE et n'interféraient pas avec la viabilité de ces derniers. Cependant les tests d'efficacité *in vitro* ont montré que le peptide « VIP », les différentes formes du propeptide de Sub 3 et le peptide 13 n'empêchent pas l'adhérence des arthrospores de *T. rubrum*. Seul le peptide 2d a révélé une capacité à diminuer l'adhérence précoce des arthrospores de *T. rubrum* aux épidermes reconstruits, comme aux explants, bien qu'il n'empêche pas le développement de l'infection à plus long terme. Le peptide inhibiteur 2d s'avère donc être le meilleur candidat en tant qu'inhibiteur fongique bien que sa concentration efficace (40-80 μ M) soit élevée et risque de poser problème en termes de coût pour la production et donc la commercialisation du produit.

Les recherches menées sur le développement d'une formulation galénique adaptée ont permis de mettre en évidence que les formulations siliconées présentaient les caractéristiques physicochimiques (taille de gouttelettes, viscosité, ...) et la stabilité (taille des gouttelettes,

viscosité et déphasage) à 4°C et 25°C attendues pour le véhicule dermatologique. L'un des objectifs principaux de la formulation galénique est en effet d'assurer une rémanence efficace au sein de la couche cornée et d'éviter autant que possible une pénétration à travers l'épiderme. Les études de diffusion sur peaux d'oreilles de cochon ont confirmé la capacité de l'émulsion de silicone à former un film à la surface cutanée assurant la persistance de l'actif sur la peau tout en évitant une pénétration du produit à travers l'épiderme. Le peptide inhibiteur n'étant pas disponible à ce moment, le miconazole, un antifongique fréquemment employé contre les mycoses, a été sélectionné comme molécule modèle pour permettre de tester le véhicule dermatologique tout en assurant une activité antifongique au produit final. Les émulsions développées contenant le miconazole ont été testées sur les modèles de dermatophytose sur épidermes humains reconstruits afin d'en étudier les effets en terme de toxicité et d'efficacité. Ceux-ci ont montré une absence de toxicité sur les RHE lorsque le miconazole est utilisé à une concentration maximale de 0,1%. L'émulsion contenant le miconazole empêche complètement le développement de l'infection sur les RHE infectés par *T. rubrum*.

L'efficacité du produit devait ensuite être évaluée *in vivo* et devait démontrer un effet préventif contre les dermatophytoses. La mise au point du modèle murin d'infection à *T. rubrum* a d'abord été réalisée sur des souris C57BL/6. Cependant, la présence du dermatophyte dans la peau n'a pas été détectée à l'examen histopathologique, ce qui rendait ce modèle d'infection imparfait. Dès lors, une tentative de mise au point sur des souris BALB/c *nude* a été entreprise. La déficience en cellules T chez ces souris devrait faciliter leur infection par une espèce fongique anthropophile ; en effet, l'immunité cellulaire médiée par les lymphocytes T CD₄⁺ est une composante essentielle dans la défense immunitaire contre l'infection par les dermatophytes. De plus, ces souris présentent un défaut de kératinisation du follicule pileux et de l'épiderme, qui résulte en une peau glabre, comme chez l'homme, ce qui pourrait faciliter également la procédure d'inoculation. Cependant, ces souris n'ont montré aucune susceptibilité à l'infection. En conclusion, le modèle *in vivo* de dermatophytose à *T. rubrum* doit encore être amélioré et par conséquent, le test d'efficacité des peptides inhibiteurs n'a pu être réalisé *in vivo*.

L'étude de prévalence des dermatophytoses devait permettre de déterminer et de comparer la différence de prévalence des dermatophytoses entre une population témoin (issue du service de Dermatologie du CHU de Liège) et une population diabétique (issue du service de diabétologie du CHU de Liège). Cependant, les échantillons obtenus sont toujours en cours d'analyse et aucune conclusion ne peut donc être tirée à ce stade.

II. Introduction

Les dermatophytoses, plus communément connues sous le nom de teignes, sont des mycoses superficielles de la peau et de ses annexes affectant l'homme [1] mais aussi les animaux de compagnie (chats, chiens, chevaux...) et les animaux de rente (bovins...) [2]. Elles sont provoquées par des champignons filamenteux pathogènes appelés dermatophytes qui se nourrissent de kératine, protéine présente dans la couche externe de la peau, les cheveux et les ongles.

Avant d'envahir les structures kératinisées, le dermatophyte doit tout d'abord adhérer à la peau. Récemment, il a été démontré que les protéases sécrétées par les dermatophytes, et plus particulièrement les endoprotéases de type subtilisine (Sub), sont impliquées dans cette première étape du processus infectieux [3]. Dans un modèle utilisant le dermatophyte *Microsporum canis* et l'épiderme félin (le chat est l'hôte naturel de ce dermatophyte), la protéase Sub 3 s'est révélée nécessaire pour permettre l'adhérence du champignon à la peau [4, 5]. En effet, l'adhérence de *M. canis* chez le chat est inhibée de 50 % avec la chymostatine (un inhibiteur spécifique des protéases de type subtilisine), de 70 % avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases, de 30 % avec des anticorps anti-Sub 3 et enfin de 90 % avec une souche déficiente pour Sub 3 obtenue par la technique d'interférence par ARN [4]. L'adhérence de *M. canis* à la peau de différentes espèces animales, mais aussi de l'homme, est également diminuée de plus de 90 % en utilisant cette souche déficiente pour Sub 3 [6]. Au laboratoire de Mycologie vétérinaire, des expériences (actuellement non publiées) indiquent que l'intervention des Sub, et en particulier celle de Sub 3, dans l'adhérence constitue un mécanisme commun à différents dermatophytes. En particulier, *Trichophyton rubrum*, l'agent responsable de la majorité des infections fongiques cutanées chez l'homme, présente une adhérence à l'épiderme humain diminuée de 50 % en présence de chymostatine. Compte tenu du pourcentage élevé d'identité de séquence en acides aminés entre les Sub des différents dermatophytes, nous avons produit le propeptide de Sub 3 de *M. canis* dans le but d'obtenir un peptide inhibant naturellement et spécifiquement les Sub des dermatophytes, y compris celles de *T. rubrum*. Ce propeptide de haute affinité inhibe parfaitement Sub 3 de *M. canis* [7] et de *T. rubrum* (données non publiées). Cependant, il ne permet pas d'inhiber l'adhérence car il est dégradé au contact des spores fongiques [7].

L'objectif spécifique visé à l'issue de ce projet consiste en la création d'un produit destiné à la prévention des dermatophytoses contenant un peptide capable d'inhiber l'activité de la protéase Sub 3, nécessaire pour l'adhérence des dermatophytes à la peau. Le peptide inhibiteur sera inclus dans une forme galénique adaptée à l'usage cutané et assurant sa rémanence au niveau de la couche cornée. L'efficacité du produit développé (peptide inhibiteur dans une forme galénique optimisée) sera évaluée *in vitro* sur des épidermes humains reconstruits puis *in vivo* sur modèle animal. Parallèlement, l'absence de toxicité du produit sera vérifiée sur épidermes reconstruits. Enfin, le produit s'étant révélé non toxique et efficace, il sera évalué à l'aide d'une étude clinique pilote effectuée chez des patients.

III. Méthodologie et résultats

1. Développement d'un modèle de dermatophytose sur épiderme humain reconstruit

1.1. Culture des épidermes humains reconstruits

Les épidermes humains reconstruits (RHE) ont été produits au départ de kératinocytes humains normaux. Ceux-ci ont été isolés à partir de prélèvements de peau humaine obtenus suite à des abdominoplasties et généreusement fournis par le Docteur Bienfait de la Clinique Saint-Luc de Bouge à Namur.

Pour les cultures primaires, les kératinocytes ont étéensemencés à une densité d'environ 5×10^4 cellules par cm^2 dans du milieu KBM-2 (Clonetics®) supplémenté par le complément KGM-2 (Clonetics®). Les cultures ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2 . Avant d'atteindre la confluence, les kératinocytes ont été détachés du substrat de culture par de la trypsine 0,025% EDTA 0,01% (Merck) et réensemencés à une densité de 5×10^3 cellules par cm^2 dans du milieu EpiLife (Cascade Biologics®) supplémenté avec le complément HKGS (Cascade Biologics®).

Pour produire les tissus reconstruits, les kératinocytes ont été utilisés après le deuxième ou troisième passage. Ils ont été récoltés, comptés etensemencés à une densité de $2,5 \times 10^5$ cellules par cm^2 sur filtre polycarbonate de 0,6 cm^2 dans un insert de culture (pores de 0,4 μm , Millipore) dans 500 μl de milieu EpiLife supplémenté avec le complément HKGS et du calcium (1,44 mM). Les inserts ont été placés dans les puits d'une plaque 6 puits contenant 2,5 ml du même milieu. Vingt-quatre heures après avoir étéensemencés sur insert, les kératinocytes ont été exposés à l'interface air-liquide par aspiration du milieu de culture persistant dans l'insert, au-dessus du filtre polycarbonate. Le milieu de culture sous l'insert a également été éliminé et remplacé par 1,5 ml de milieu EpiLife complétement en HKGS auquel ont été ajoutés du calcium (1,44 mM), de la vitamine C (91,4 ng/ml) et du facteur de croissance pour kératinocytes KGF (10 ng/ml). Les cultures ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO_2 pendant 11 jours avec changement du milieu de culture tous les deux jours. Au terme des 11 jours de culture, un tissu reconstruit possédant des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles comparables à celles d'un épiderme humain *in vivo* a été obtenu [9].

1.2. Modèle de dermatophytose à *Trichophyton rubrum* sur épiderme humain reconstruit

Un modèle *in vitro* de dermatophytose utilisant l'espèce *T. rubrum* a été mis au point sur RHE. L'espèce *T. rubrum* a été choisie parce que, d'une part il s'agit d'une espèce anthropophile mieux adaptée à l'infection de tissus humains, et d'autre part car cette espèce est responsable de plus de 90 % des infections chez l'homme [10]. C'est donc contre celle-ci qu'un traitement préventif devra être le plus efficace.

La mise au point du modèle de dermatophytose à *T. rubrum* sur RHE s'est inspirée du protocole d'infection d'un épiderme félin reconstruit (RFE) par le dermatophyte zoophile *M. canis*, mis au point précédemment au laboratoire de Mycologie vétérinaire de l'Université de Liège [8]. Pour réaliser ce modèle de dermatophytose, 1×10^5 arthrospores de *M. canis* ont été appliquées de manière topique sur les RFE. Cinq jours après inoculation, une coloration histochimique à l'acide periodique de Schiff (PAS), qui met spécifiquement en évidence les glucides, et donc la chitine présente dans la paroi des champignons, révélait la présence d'éléments fongiques dans la couche cornée des RFE.

Le premier essai de mise au point du modèle de dermatophytose sur RHE a donc consisté en l'application topique de 5×10^4 , 1×10^5 ou 2×10^5 arthrospores de *T. rubrum*, souche IHEM13894, en suspension dans 200 μ l de PBS, sur les RHE. Les RHE étaient eux-mêmes placés dans les puits d'une plaque de culture 24 puits dans 500 μ l de milieu de culture EpiLife supplémenté en HKGS, en calcium, en vitamine C et en KGF. Un RHE sur lequel du PBS seul a été appliqué a servi de contrôle. Vingt-quatre heures après l'inoculation, les kératinocytes ont été réexposés à l'interface air-liquide par élimination du PBS, et éventuellement des arthrospores non-adhérentes restées en surface des RHE. Les RHE ont alors été incubés à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ durant 4 jours avec changement du milieu de culture tous les jours. Au terme de cette période, les RHE infectés et contrôle ont été récupérés, fixés et un marquage histochimique au PAS, avec contre-coloration à l'hémalum, a été réalisé (**Figure 1**).

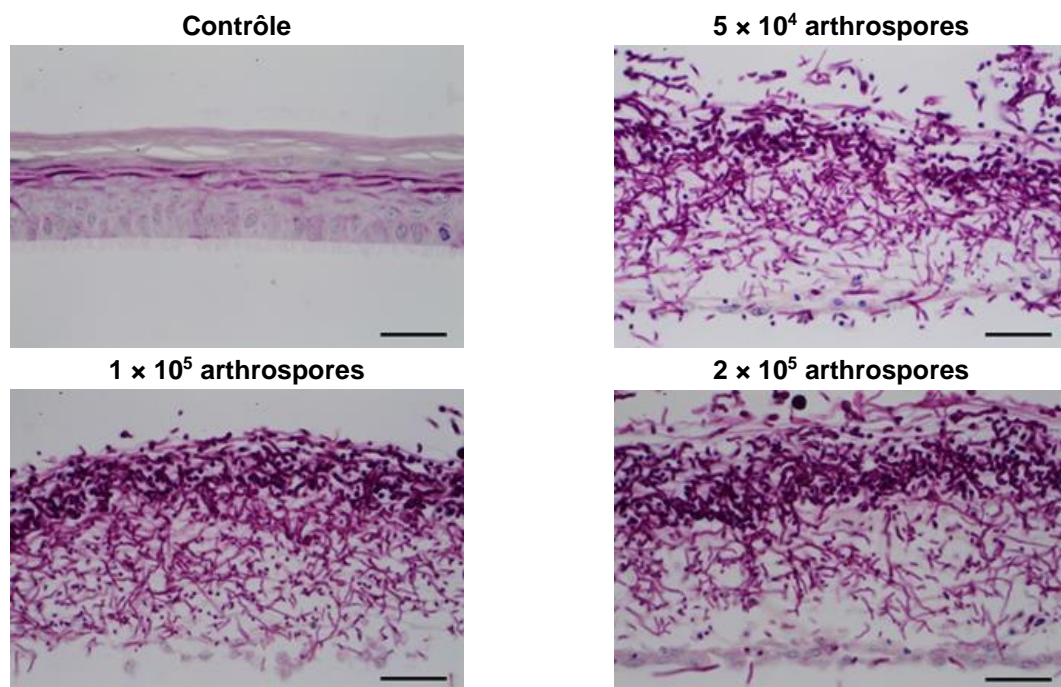


Figure 1 : Marquage à l'acide periodique de Schiff (PAS), avec contre-coloration à l'hémalum, des RHE quatre jours après inoculation avec 5×10^4 , 1×10^5 ou 2×10^5 arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 ou avec du PBS seul (contrôle). Barres d'échelles : 50 μ m.

Les résultats ont montré que les quantités d'arthrospores utilisées dans le premier essai d'infection étaient beaucoup trop importantes. En effet, au terme des 4 jours, les éléments fongiques ont envahi l'entièreté de l'épiderme, détruisant toutes les couches de kératinocytes, alors que, *in vivo*, chez des patients avec un statut immunitaire sain, l'infection reste limitée à la couche cornée.

D'un point de vue technique, la couche granuleuse de l'épiderme contrôle, sur lequel seul du PBS a été appliqué, est également mise en évidence par le PAS suite à une accumulation de glycogène. Ce marquage non désiré pourrait prêter à confusion lors de l'identification des éléments fongiques. Pour les tests suivants, un prétraitement à l' α -amylase, enzyme digérant le glycogène, sera donc réalisé avant coloration au PAS (**Figure 2**).

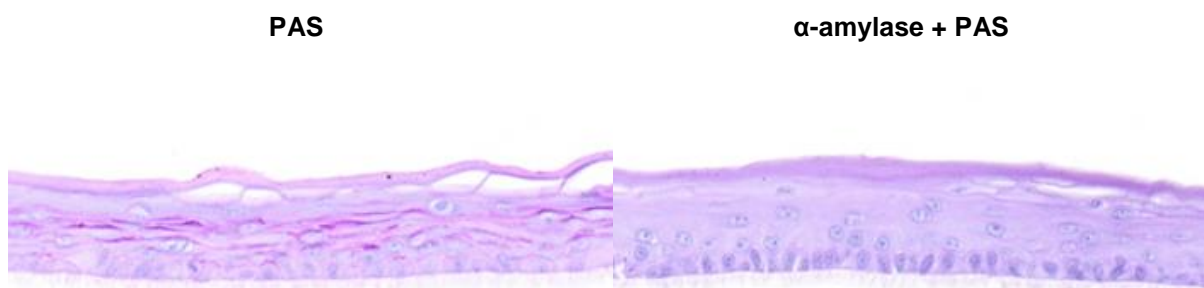


Figure 2 : Marquage au PAS avec ou sans prétraitement à l' α -amylase, et avec contre-coloration à l'hémalum, d'un RHE contrôle. Barres d'échelles : 20 μ m.

Dans un second essai d'infection, la quantité d'arthrospores appliquées de manière topique sur les épidermes reconstruits a été divisée par deux de manière successive ; les RHE ont ainsi été inoculés par 5×10^4 , $2,5 \times 10^4$, $1,25 \times 10^4$, $6,25 \times 10^3$, $3,125 \times 10^3$, $1,562 \times 10^3$ ou $7,81 \times 10^2$ arthrospores de *T. rubrum* ou par du PBS seul (contrôle). Le protocole d'infection était identique à celui utilisé lors du premier essai. Les marquages au PAS avec prétraitement à l' α -amylase des RHE infectés et contrôle sont exposés à la **Figure 3**.

Dans les épidermes inoculés avec des quantités allant de $3,125 \times 10^3$ à 5×10^4 arthrospores de *T. rubrum*, toutes les couches de kératinocytes étaient envahies au terme des quatre jours. Par contre, les éléments fongiques restaient confinés dans la couche cornée des RHE inoculés avec $1,562 \times 10^3$ arthrospores. Lorsque les RHE étaient inoculés avec $7,81 \times 10^2$ arthrospores, l'infection après 4 jours, semblait plus diffuse bien que principalement localisée au niveau de la couche cornée. Il semble donc que la quantité d'arthrospores de *T. rubrum* à utiliser pour observer une infection des RHE semblable à l'infection *in vivo*, c'est-à-dire limitée à la couche cornée, soit d'environ 1×10^3 arthrospores, ce qui correspond à une densité de $1,7 \times 10^3$ arthrospores / cm^2 .

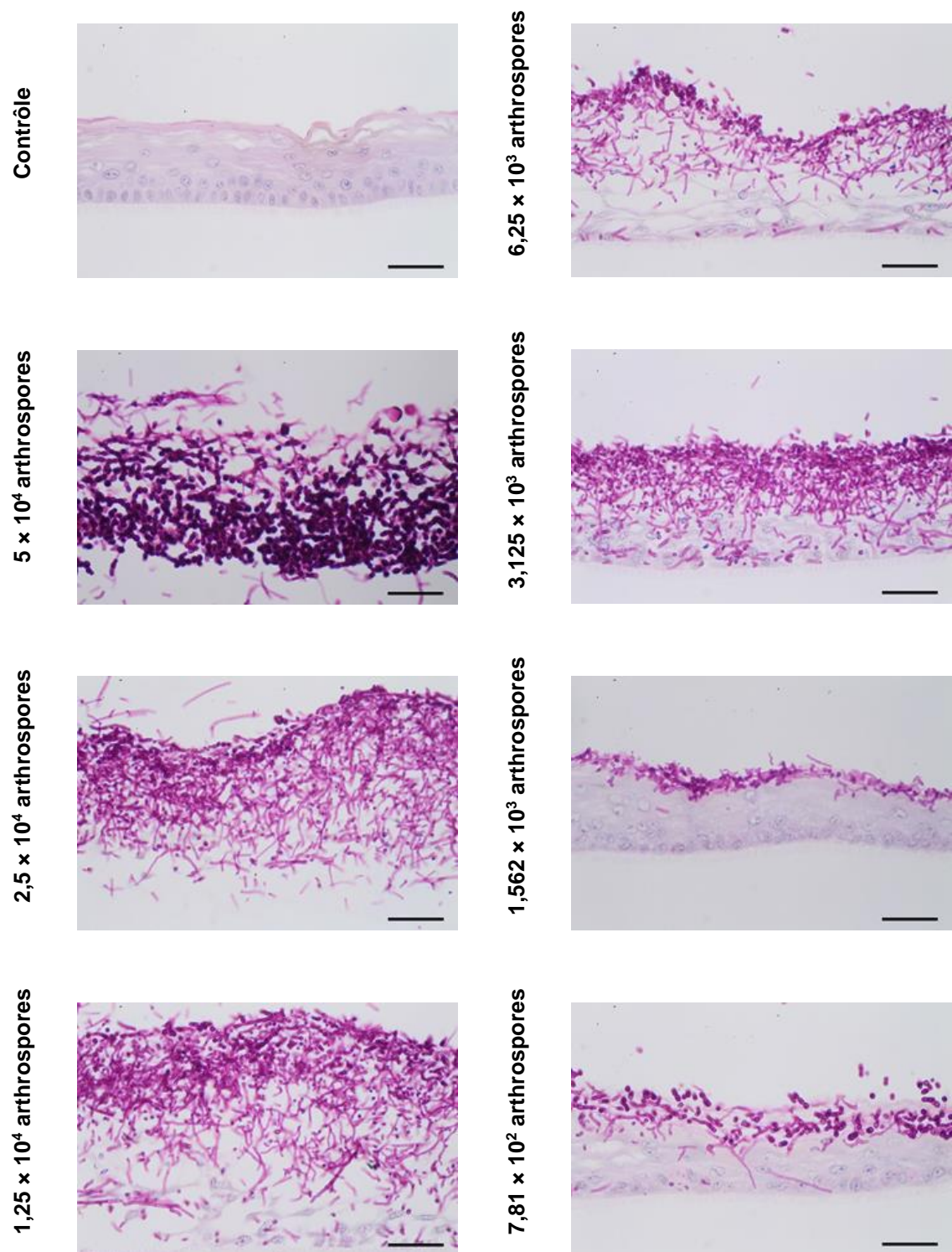


Figure 3 : Marquage au PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalun des RHE quatre jours après inoculation avec différentes quantités d'arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894, allant de 5×10^4 à $7,81 \times 10^2$ arthrospores, ou avec du PBS seul (contrôle). Barres d'échelle : 50 μ m.

Au vu des résultats de ces premiers essais, le protocole d'infection suivant a été retenu : les RHE sont placés dans les puits d'une boîte de culture 24 puits dans 500 μ l de milieu de culture EpiLife supplémenté en HKGS, en calcium, en vitamine C et en KGF. Ils sont alors inoculés par les arthrospores de *T. rubrum* en suspension dans 200 μ l de PBS à une densité de $1,7 \times 10^3 / \text{cm}^2$. Quatre heures après l'inoculation, les kératinocytes sont réexposés à l'interface air-liquide par élimination du PBS resté en surface des RHE, et les arthrospores non-adhérentes sont éliminées par trois rinçages successifs avec 200 μ l de PBS. Les épidermes infectés sont ensuite incubés à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ durant 4 jours avec changement du milieu de culture tous les jours (**Figure 4 A**).

Chaque jour, un épiderme infecté a été récupéré et marqué par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase afin d'observer la progression de l'infection (**Figure 4 B**). Les arthrospores de *T. rubrum* ont colonisé progressivement la couche cornée des RHE au cours des 4 jours suivant l'inoculation sans envahir les couches de kératinocytes vivants.

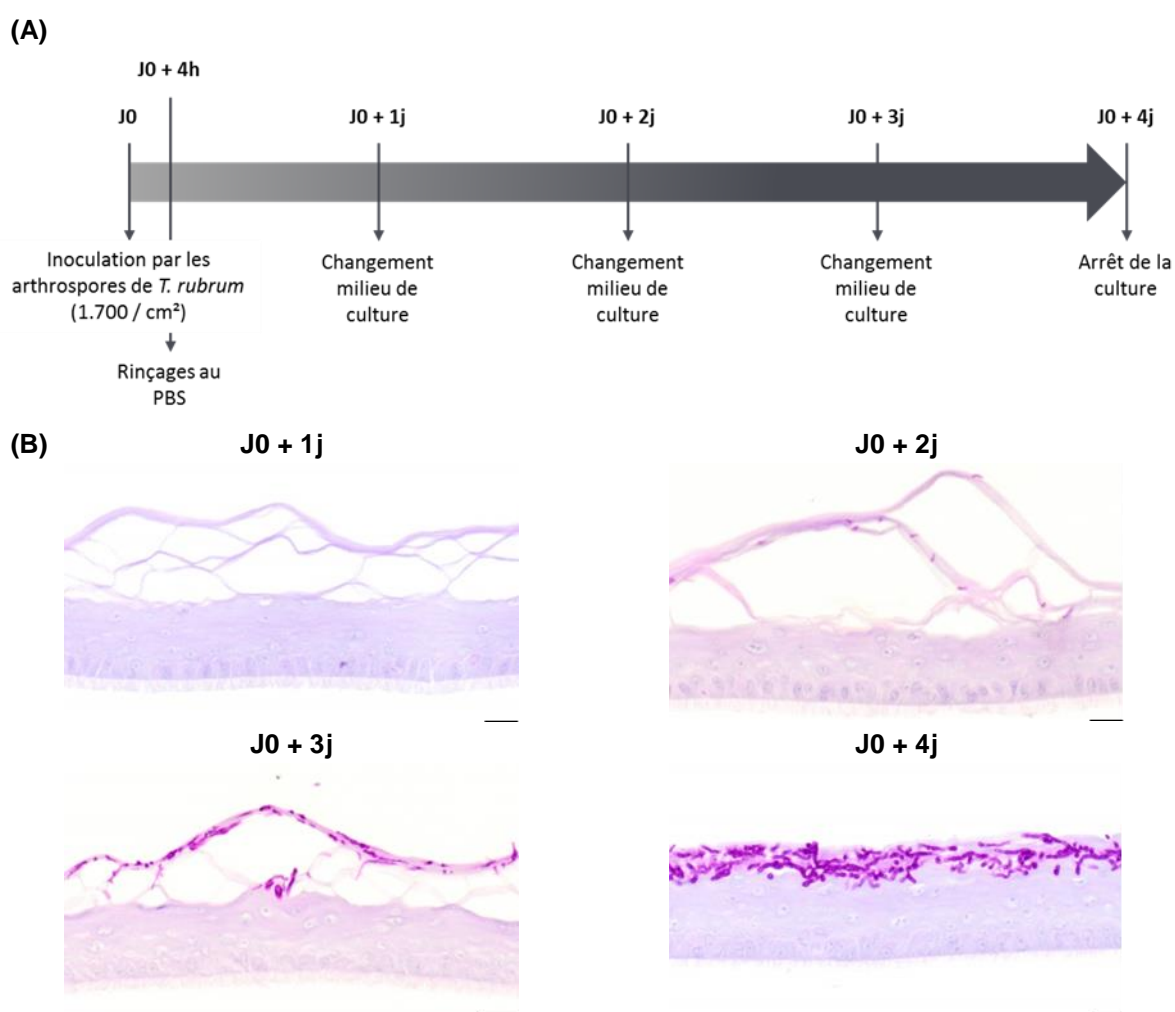


Figure 4 : (A) Protocole d'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum*, J0 correspondant au jour de l'inoculation. (B) Marquage au PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE au cours de l'infection par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894. Barres d'échelle : 20 μ m.

Pour valider le modèle, les RHE ont été infectés avec les arthrospores de deux autres souches de *T. rubrum*, les souches IHEM 13809 et IHEM 13886. Le marquage des épidermes 4 jours après l'inoculation montre que les arthrospores des différentes souches de *T. rubrum* ont envahi le tissu de manière similaire (**Figure 5**). Pour les expériences ultérieures, seules la souche IHEM 13894 de *T. rubrum* a été utilisée.

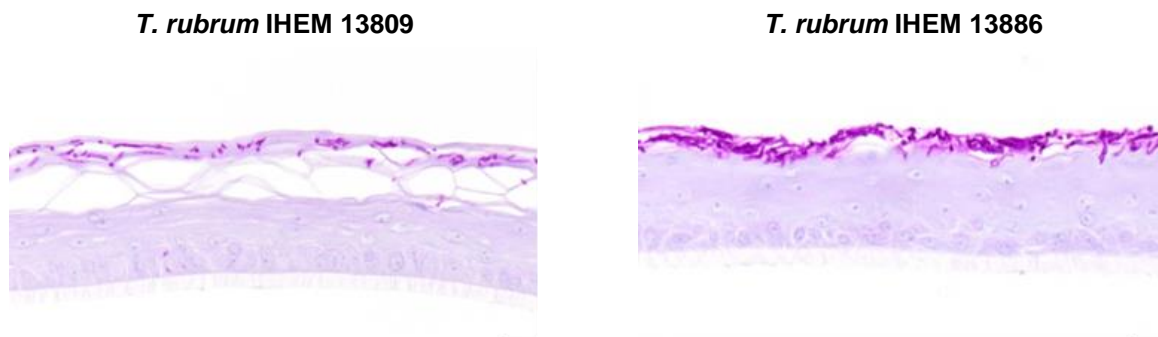


Figure 5 : Marquage au PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE quatre jours après l'inoculation par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13809 ou IHEM 13886. Barres d'échelle : 20 μ m.

En conclusion, le modèle de dermatophytose à *T. rubrum* mis au point sur RHE est comparable à l'infection *in vivo* puisque l'invasion reste limitée à la couche cornée, et peut dès lors être utilisé pour les tests d'efficacité des peptides inhibiteurs de Sub 3, potentiellement préventifs de l'infection. La mise au point du modèle, ainsi que sa caractérisation, ont été publiées dans la revue *Medical Mycology* [11].

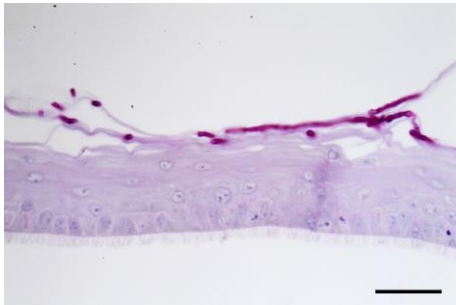
1.3. Modèle de dermatophytose sur épiderme humain reconstruit utilisant d'autres espèces de dermatophytes

Le modèle de dermatophytose mis au point pour l'espèce *T. rubrum* devra être adapté pour d'autres espèces de dermatophytes. En effet, dans le cadre de la mise au point d'un traitement préventif, efficace contre l'ensemble des espèces de dermatophytes, il est primordial de pouvoir tester l'efficacité de ces traitements face à différentes espèces.

Ainsi les épidermes reconstruits ont été infectés par les arthrospores de *M. canis* IHEM 21239 ou par les arthrospores d'*A. benhamiae* IHEM 20163 en utilisant le même protocole d'infection que pour *T. rubrum*. Différentes tailles d'inoculum ont été testées afin de déterminer la quantité d'arthrospores de ces espèces zoophiles nécessaire au développement d'une infection similaire à celle obtenue avec les arthrospores de *T. rubrum* à une densité de $1,7 \times 10^3$ / cm². Au quatrième jour suivant l'inoculation, l'infection des RHE était limitée à la couche cornée des RHE lorsque les densités d'arthrospores utilisées étaient respectivement de $1,7 \times 10^4$ / cm² et de 53 / cm² pour *M. canis* et *A. benhamiae* (**Figure 6**).

Ces résultats suggèrent que le modèle de dermatophytose sur RHE pourrait être adapté pour de nombreuses espèces de dermatophytes, anthropophiles et zoophiles, par modulation de la taille de l'inoculum.

***M. canis* IHEM 21239**



***A. benhamiae* IHEM 20163**

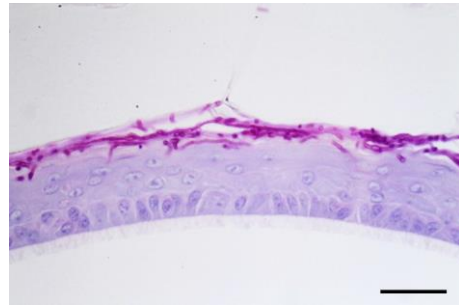


Figure 6 : Marquage au PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE quatre jours après l'inoculation par les arthrospores de *M. canis* IHEM 21239 ou d'*A. benhamiae* IHEM 20163 à des densités respectives de $1,7 \times 10^4$ / cm² et 53 / cm². Barres d'échelle : 50 μ m.

1.4. Quantification de l'infection par PCR quantitative

Une méthode basée sur la PCR quantitative a été mise au point pour quantifier l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum*. Concrètement, cette technique permet de déterminer le nombre de copies de l'ADN ribosomique (ADNr) 18S de *T. rubrum*, et donc indirectement le nombre d'éléments fongiques, dans l'échantillon.

Premièrement, une courbe standard, consistant en des dilutions successives d'un échantillon contenant un nombre connu de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum*, a été réalisée. Dans ce but, l'ADN génomique total de *T. rubrum* a été extrait à partir de 10 mg de mycélium récolté sur milieu de Sabouraud. Pratiquement, les éléments fongiques ont été découpés avec des lames de scalpel puis placés dans du tampon *ATL buffer* et homogénéisés pendant une minute avec un *Tissue Grinder* (NIPPON Genetics). L'ADN total a ensuite été extrait en utilisant le *DNeasy® Blood and Tissue Kit* (Qiagen) selon les recommandations du manufacturier. A partir de l'ADN total de *T. rubrum*, la séquence du gène de l'ADNr 18S a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces 18SrDNA-F (5'-TAACGAACGAGACCTTAACC-3') et 18SrDNA-R (5'-TTATTGCCTCAAACCTCCAT-3'), précédemment décrite par Paugam et al. [12] et commandées chez Eurogentec. Trente nanogrammes d'ADN total ont été mélangés avec 0,3 mM de dNTP, 50 mM de MgSO₄, 1X *Pfx amplification buffer* (Invitrogen), 1 unité de *Platinum Pfx DNA polymerase* (Invitrogen) et 300 nM de chaque amorce dans un volume total de 50 μ l. Le programme d'amplification a consisté en 5 minutes de dénaturation à 94°C, suivies de 40 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C et 45 secondes à 68°C, avec une élongation finale de 10 minutes à 68°C. Les produits PCR ont finalement été purifiés à l'aide du *MinElute® Purification Kit* (Qiagen). Le degré de pureté et la quantité d'ADN purifié ont été déterminés au *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific) et le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* a été calculé en utilisant le nombre d'Avogadro. La concentration de l'échantillon standard a alors été ajustée à 10^{10} copies / μ l et la courbe standard est obtenue par des dilutions successives allant de 10^8 à 10^1 copies / μ l.

Préalablement, la spécificité des amorces 18SrDNA-F et 18SrDNA-R avait été vérifiée. Pour ce faire, l'ADN total a été extrait à partir des mycéliums de *T. rubrum*, d'*A. benhamiae* ou de *M. canis*. En effet, la séquence de l'ADNr 18S est conservée entre ces trois espèces. L'ADN total a également été extrait à partir d'un RHE contrôle non-infecté et d'un RHE infecté par les arthrospores de *T. rubrum* 4 jours après l'inoculation. La séquence du gène de l'ADNr 18S a

alors été amplifiée par PCR, en utilisant les amorces 18SrDNA-F et 18SrDNA-R. Après purification, les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, marqué au bromure d'éthidium et observé sous lampe ultraviolette. La spécificité des amorces est confirmée par l'observation d'un produit PCR unique de taille attendue (105 paires de bases) pour les ADN extraits à partir des mycéliums de *T. rubrum*, *A. benhamiae* et *M. canis* ainsi que pour l'ADN extrait de l'épiderme infecté (**Figure 7**). Par contre, aucun produit PCR n'est détecté pour l'ADN extrait à partir de l'épiderme contrôle non-infecté.

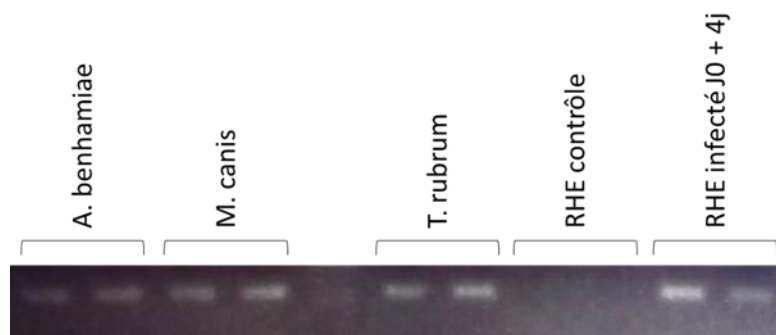


Figure 7 : Electrophorèse sur gel d'agarose, marqué au bromure d'éthidium et observé sous lampe ultraviolette, des produits d'amplification du gène de l'ADNr 18S à partir de l'ADN extrait des mycéliums de *T. rubrum*, *A. benhamiae* ou *M. canis*, ou d'un RHE contrôle non-infecté, ou d'un RHE infecté par les arthrospores de *T. rubrum* 4 jours après l'inoculation (n=2).

Dans le but de quantifier l'infection de l'épiderme, les RHE ont été infectés avec les arthrospores de *T. rubrum* comme décrit précédemment. L'ADN total a été extrait de ces épidermes infectés 1, 2, 3 et 4 jours après l'inoculation en utilisant le DNeasy® *Blood and Tissue Kit* (Qiagen) après une minute d'homogénéisation au *Tissue Grinder* (NIPPON Genetics). L'ADN total extrait d'un épiderme non infecté a servi de contrôle négatif. Une PCR quantitative a alors été réalisée pour déterminer le nombre de copies de l'ADNr 18S dans ces échantillons. Le mix d'amplification était composé de Takyon™ ROX SYBR® Master Mix (Eurogentec), de 300 nm de chaque amorce (18SrDNA-F et 18SrDNA-R) et de 20 ng d'ADN dans un volume total de 20 µl. Le programme d'amplification a consisté en 10 minutes de dénaturation à 95°C, suivies de 45 cycles de 10 secondes à 95°C, 10 secondes à 60°C et 10 secondes à 72°C. Finalement, la quantification absolue a été déterminée sur base de la courbe standard et montre une augmentation importante du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* au cours de l'infection (**Figure 8**).

Cette méthode de quantification de l'infection par PCR quantitative permettra non seulement de contrôler le niveau d'infection au cours du temps, mais surtout de comparer de manière quantitative le niveau d'infection dans différentes conditions, par exemple en présence ou non d'un peptide potentiellement préventif de l'infection.

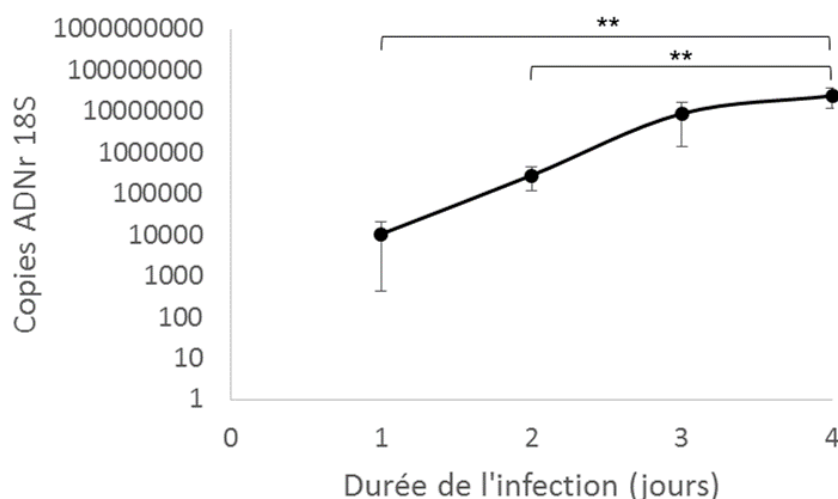


Figure 8 : Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* au cours de l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 (n=3 ± SD; **p<0,01; ANOVA1).

1.5. Remarque concernant le niveau d'infection dans le modèle de dermatophytose sur épiderme humain reconstruit

Le modèle de dermatophytose à *T. rubrum* mis au point sur RHE est comparable à l'infection *in vivo* puisque l'invasion de l'épiderme par les éléments fongiques reste limitée à la couche cornée. Toutefois, il faut se rendre compte que le niveau d'infection obtenu dans notre modèle est plus important que celui observé dans les biopsies de lésions de patients atteints de dermatophytose. Cette « surinfection » de notre modèle est intentionnelle pour permettre une détection plus facile de celle-ci. En effet, en réduisant trop la taille de l'inoculum, il devient difficile, voire impossible de détecter les éléments fongiques par marquage histochimique.

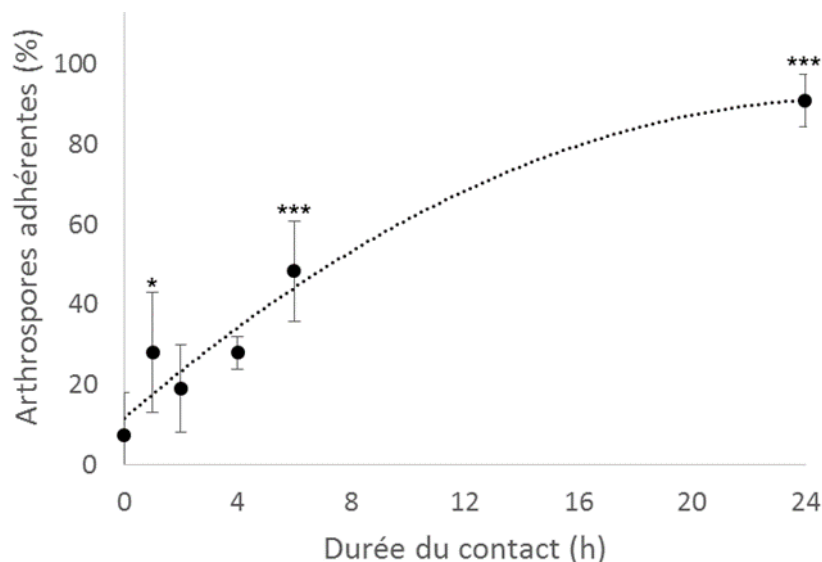
Dans le contexte des tests d'efficacité de peptides inhibiteurs potentiellement préventifs de l'infection, cette « surinfection » peut être problématique. En effet, l'effet de prévention des peptides inhibiteurs pourrait être « dépassé » par le trop grand nombre d'éléments fongiques et nous pourrions donc ne pas le détecter. C'est pourquoi la taille de l'inoculum pourra être réduite lors des tests d'efficacité des peptides inhibiteurs. L'analyse de l'infection se fera alors uniquement par PCR quantitative, méthode plus sensible que les marquages histochimique.

1.6. Cinétique d'adhérence des arthrospores

Afin d'étudier la cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE, le protocole d'infection décrit précédemment a été suivi à l'exception de l'étape de rinçage qui a été effectuée à différents moments après l'inoculation. Les arthrospores non-adhérentes ont ainsi été récupérées par cette étape de rinçage 1, 2, 4, 6 ou 24 heures après l'inoculation. En condition contrôle, les arthrospores non-adhérentes ont été récupérées immédiatement (0h) après l'inoculation, c'est-à-dire que ces arthrospores ont été appliquées topiquement sur les RHE et directement récupérées. Les arthrospores non-adhérentes récupérées ont ensuite été ensemencées sur milieu de Sabouraud et incubées à 27°C pendant 7 jours. Les unités formant colonies (UFC) ont alors été dénombrées et, connaissant le nombre d'arthrospores appliquées

au départ sur les RHE, le pourcentage d'arthrospores adhérentes après ces différentes durées de contact a pu être calculé (**Figure 9 A**). Les épidermes restés au contact des arthrospores pendant ces différentes durées ont été maintenus en culture pendant 4 jours au terme desquels ils ont été récupérés et marqué par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase (**Figure 9 B**).

(A)



(B)

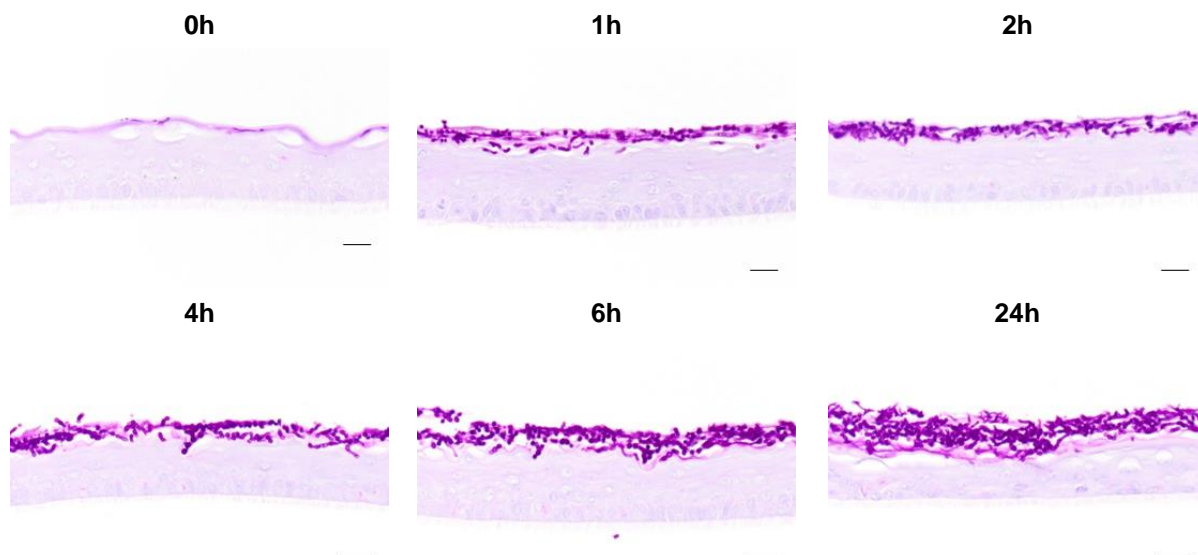


Figure 9 : (A) Cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 au RHE ($n=3 \pm SD$; * $p<0,05$ *** $p<0,01$; t Student par rapport au contrôle 0h). (B) Marquage au PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE quatre jours après l'inoculation par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 en fonction de la durée du contact. Barres d'échelle : 20 μm .

Conformément à ce qui était attendu, le pourcentage d'arthrospores adhérentes augmente au cours du temps après inoculation, allant de 9% lorsque les arthrospores sont éliminées immédiatement à 91 % lorsque la durée du contact entre épiderme et arthrospores est de 24 heures. Ces résultats sont en accord avec l'analyse histologique qui révèle que le niveau d'invasion des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* est plus important lorsque la durée du contact est plus longue. Quelques éléments fongiques sont visibles dans la couche cornée des épidermes qui ont été rincés immédiatement, en accord avec les 9% d'adhérence calculés à 0 heure. Cela pourrait signifier soit que l'adhérence est un processus immédiat, ou, plus probablement, que l'étape de rinçage n'est pas optimale. De fait, si quelques arthrospores non-adhérentes ne sont pas récupérées par les rinçages, elles restent en surface de l'épiderme et ont alors tout le temps d'y adhérer et de l'envahir.

1.7. Implication de Sub3 dans l'adhérence des arthrospores au modèle d'épiderme humain reconstruit

L'implication de la protéase Sub 3 dans l'adhérence des arthrospores de *M. canis* à la peau de différentes espèces animales et de l'homme a été démontrée par l'équipe du Prof. Mignon au laboratoire de Mycologie Vétérinaire de l'université de Liège [6]. Avant de commencer les tests d'efficacité des peptides inhibiteurs de Sub 3 sur le modèle de dermatophytose sur RHE, l'implication de Sub 3 dans l'adhérence des arthrospores de *dermatophytes* aux épidermes humains reconstruits a été vérifiée.

1.7.1. Souche *M. canis* invalidée pour Sub3

Une souche de *M. canis* déficiente pour Sub 3 (*M. canis* IHEM 22957 sub3-silenced), obtenue par la technique d'interférence ARN [4], nous a été fournie par l'équipe du Prof. Mignon du laboratoire de Mycologie Vétérinaire de l'université de Liège. L'adhérence des arthrospores de *M. canis* sub3-silenced aux RHE, ainsi que le niveau d'invasion de l'épiderme, ont pu être comparés par rapport aux arthrospores d'une souche contrôle de *M. canis* avec une expression conservée de Sub 3.

Les RHE ont été inoculés par les arthrospores de *M. canis* IHEM 22957 sub3-silenced, ou d'une souche contrôle de *M. canis* IHEM 22958, à une densité de $1,7 \times 10^4$ /cm². Les arthrospores non-adhérentes ont été récupérées par des rinçages au PBS réalisés immédiatement (0h), 30 minutes, 1, 2 ou 4 heures après l'inoculation et ensemencées sur des boîtes de Sabouraud. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les UFC ont été dénombrées et le pourcentage d'adhérence a pu être calculé (**Figure 10 A**). En parallèle, les épidermes infectés ont été maintenus en culture et récupérés au terme de quatre jours et un marquage par le PAS a été réalisé (**Figure 10 B**). Pour l'analyse morphologique, seuls les RHE infectés qui ont été rincés après 4 heures sont montrés, les résultats étant similaires pour les RHE rincés plus tôt.

Aucune différence, ni dans le pourcentage d'adhérence, ni dans le niveau d'invasion des épidermes, n'est détectée entre la souche sub3-silenced de *M. canis* et la souche contrôle.

Cependant, la souche *M. canis* IHEM 22957 sub3-silenced était conservée au laboratoire de Mycologie Vétérinaire et n'avait plus été utilisée depuis longtemps. L'invalidation de gènes par la méthode de l'interférence ARN n'étant pas une modification stable, il est possible que l'invalidation de Sub 3 ne soit plus efficace. Un contrôle de la souche sub3-silenced devrait donc être effectué pour s'assurer de la non-expression de Sub 3.

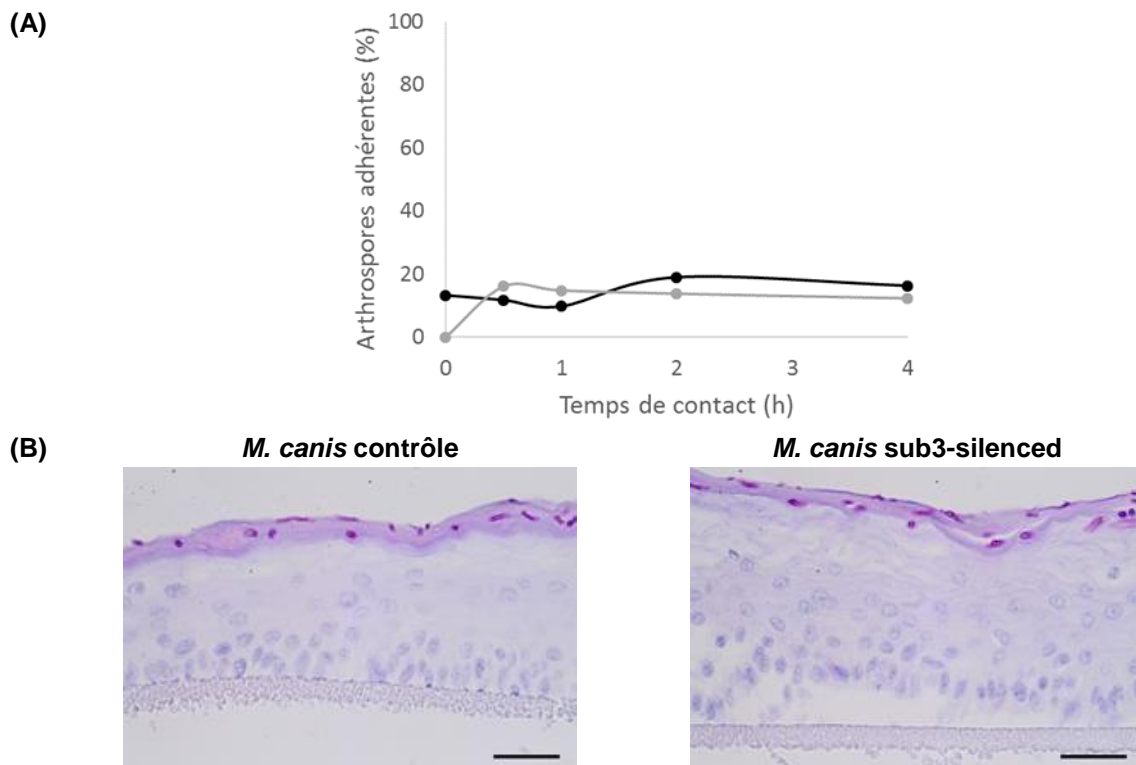


Figure 10 : (A) Cinétique d'adhérence des arthrospores d'une souche contrôle de *M. canis* IHEM 22958 (noir), ou de la souche sub3-silenced de *M. canis* IHEM 22957 (gris), ensemencées à une densité de $1,7 \times 10^4 / \text{cm}^2$, aux RHE (n=2). (B) Marquage par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE infectés par les arthrospores des souches contrôle (IHEM 22958) et sub3-silenced (IHEM 22957) de *M. canis* et rincés après 4 heures. Barres d'échelles : 50 μm .

1.7.2. Chymostatine

La chymostatine est un inhibiteur spécifique des protéases de type subtilisine et a été utilisée à une concentration de 100 μM pour vérifier le rôle de Sub 3 dans l'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE.

Premièrement, la capacité de la chymostatine à conserver son pouvoir inhibiteur de Sub 3 au contact des épidermes humains reconstruits a été évaluée par un test d'activité de Sub 3 utilisant le substrat synthétique AAPF-pNa. En pratique, la chymostatine est utilisée soit directement après sa sortie du frigo (condition optimale), soit après 4 heures d'incubation à 37°C ou après 4 heures d'incubation en application topique sur les RHE à 37°C. La

chymostatine est alors récupérée et mise en présence de la protéase Sub 3 recombinante (0,55 μ M) de *T. rubrum* ou de *M. canis* et de son substrat AAPF-pNa (1 mM). L'activité résiduelle de Sub 3 est déterminée par mesure de l'absorbance à 405 nm 5 minutes après l'ajout du substrat (**Figure 11 A**).

L'activité enzymatique de la protéase Sub 3 recombinante de *T. rubrum*, ou de *M. canis*, seule est considérée comme 100%. La chymostatine en condition optimale inhibe l'activité de Sub 3 à plus de 90% ; en effet, en présence de chymostatine en condition optimale, les activités résiduelles de Sub 3 de *T. rubrum* et de *M. canis* sont respectivement de 4% et 7%. La chymostatine conserve un pouvoir inhibiteur de plus de 90% de Sub 3 même après 4 heures d'incubation à 37°C ou sur RHE.

Deuxièmement, un test de survie a été effectué pour s'assurer que la chymostatine à une concentration de 100 μ M n'avait pas d'impact sur la survie des RHE. Brièvement, le test utilisé est le test MTT, un test de viabilité cellulaire basé sur l'utilisation du sel de tétrazolium MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Ce sel a la propriété d'être réduit par la succinate-déshydrogénase mitochondriale lorsque les cellules sont métaboliquement actives. Le produit de cette réduction est le formazan, composé insoluble de couleur violette, dont la concentration dans le milieu peut être évaluée par mesure de l'absorbance à 540 nm. La chymostatine a donc été appliquée de manière topique sur les RHE. Après 4 heures d'incubation à 37°C, les RHE ont été soumis à un test MTT et le pourcentage de survie par rapport à un épiderme contrôle non traité à la chymostatine a été calculé (**Figure 11 B**).

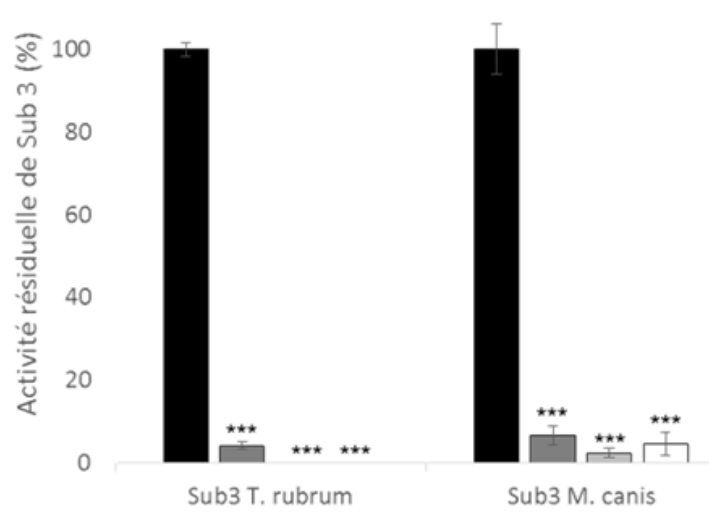
La chymostatine n'ayant pas d'impact significatif sur la survie des RHE, des tests d'infection en présence de chymostatine ont été réalisés.

Les RHE ont été inoculés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de $1,7 \times 10^3$ / cm² seules (contrôle) ou en présence de 100 μ M de chymostatine. Les arthrospores non-adhérentes ont été récupérées par des rinçages au PBS réalisés 1, 2 ou 4 heures après l'inoculation et ensemencées sur milieu de Sabouraud. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les UFC ont été dénombrées et le pourcentage d'adhérence a pu être calculé (**Figure 12 A**). En parallèle, les épidermes infectés ont été maintenus en culture et récupérés au terme de quatre jours. L'ADN a alors été extrait de ces épidermes dans le but de quantifier le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* (**Figure 12 B**). Un marquage par le PAS a également été réalisé (**Figure 12 C**). Pour le marquage, seuls les RHE infectés qui ont été rincés après 4 heures sont montrés, les résultats étant similaires pour les RHE rincés après 1 et 2 heures.

Le pourcentage d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE est réduit en présence de chymostatine, et cette diminution est statistiquement significative lorsque la durée du contact est d'une heure. Le taux d'infection des RHE, déterminé par PCR quantitative au quatrième jour d'infection, est également diminué en présence de chymostatine, de façon statistiquement significative lorsque les rinçages ont été effectués 1 et 2 heures après l'inoculation. De plus, bien que les marquages histochimiques ne soient pas quantitatifs, l'invasion des épidermes quatre jours après l'inoculation apparaît moins étendue en présence de chymostatine.

L'inhibition des protéases de type subtilisines par la chymostatine permet donc de diminuer l'adhérence précoce des arthrospores de *T. rubrum* aux épidermes humains reconstruits.

(A)



(B)

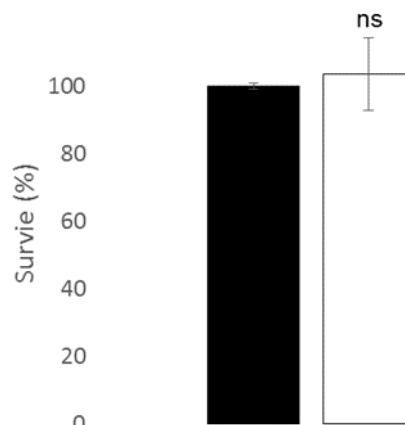


Figure 11 : (A) Activité résiduelle de la protéase Sub 3 de *T. rubrum* ou *M. canis* seule (noir), en présence de chymostatine en condition optimale (gris foncé), en présence du chymostatine après incubation 4h à 37°C sur RHE (gris clair) ou en présence de chymostatine après 4h d'incubation à 37°C (blanc) ($n=3 \pm SD$; *** $p<0,001$; ANOVA1). (B) Pourcentage de survie des RHE après 4 heures d'incubation en présence de chymostatine (blanc) par rapport à des RHE contrôles non-traités (noir) ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p\geq 0,05$; t Student).

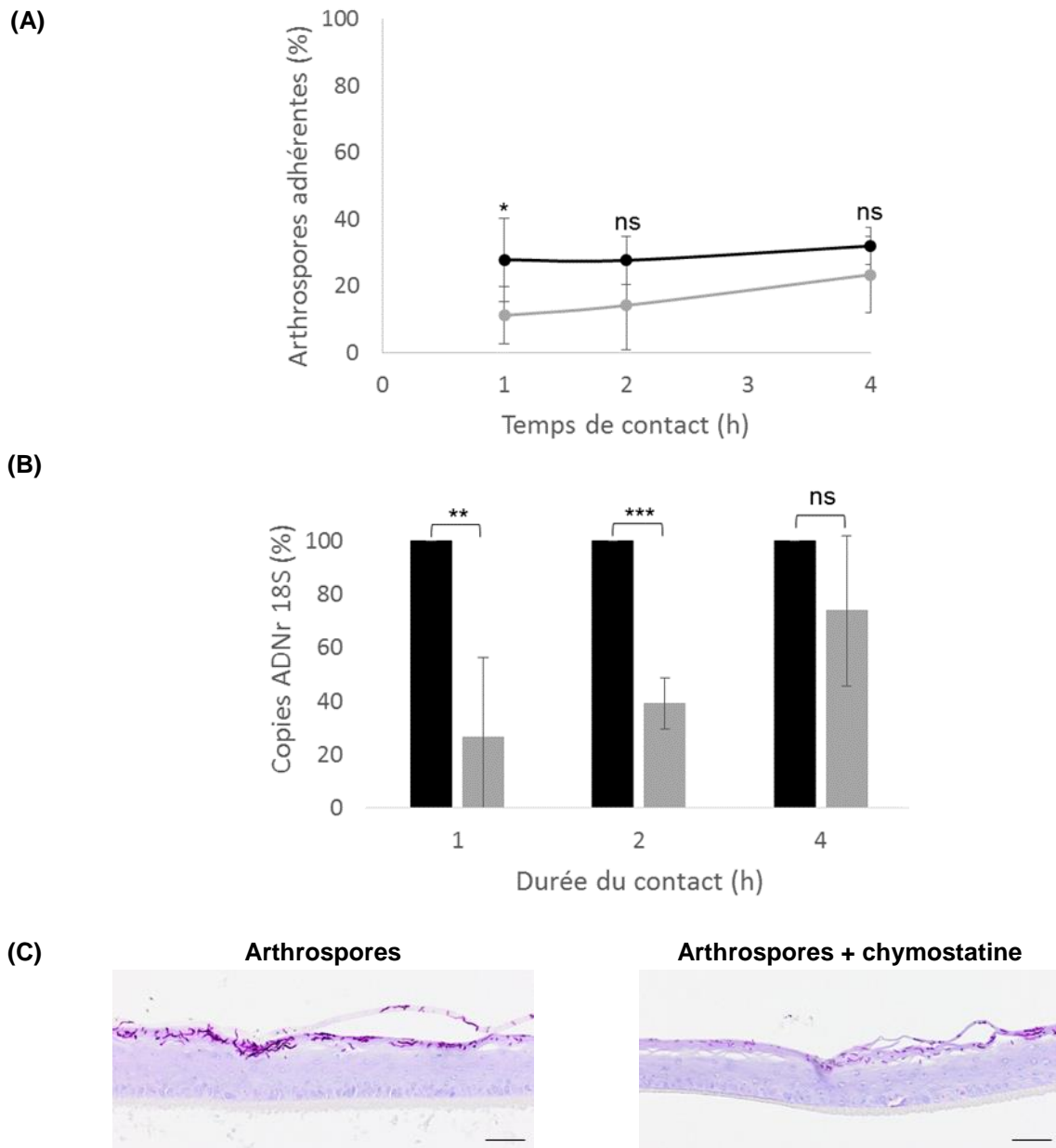


Figure 12 : (A) Cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894, ensemencés à une densité de $1,7 \times 10^3 / \text{cm}^2$, au RHE en présence (gris) ou non (noir) de chymostatine ($n=3 \pm \text{SD}$; * $p<0,05$ $^{ns}p\geq 0,05$; t Student). (B) Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* quatre jours après l'inoculation des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* en présence (gris) ou non (noir) de chymostatine. Les rinçages ont été effectués après 1, 2 ou 4 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de copies de l'ADNr 18S détectés par rapport au épiderme infectés en absence de chymostatine ($n=3 \pm \text{SD}$; ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ $^{ns}p\geq 0,05$; t Student). (C) Marquage par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE infectés par les arthrospores de *T. rubrum* en présence ou non de chymostatine, et rincés après 4 heures. Barres d'échelles : 50 μm .

1.8. Modèle valide pour tester l'efficacité de composés antifongiques

Le modèle de dermatophytose mis au point servira, entre autres, à tester l'efficacité des peptides inhibiteurs de la protéase Sub 3. Dans ce contexte, un agent antifongique reconnu, le miconazole, a été utilisé afin de s'assurer que le modèle pouvait servir pour tester l'efficacité d'agents antifongiques. Le miconazole fonctionne par inhibition de la synthèse de l'ergostérol, composé membranaire indispensable à la survie des champignons.

Premièrement, la concentration minimale inhibitrice du miconazole, c'est-à-dire la plus petite concentration de miconazole qui empêche la croissance des arthrospores de *T. rubrum*, a été déterminée. Cent arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894, en suspension dans 100 µl de PBS contenant différentes concentrations de miconazole, allant de 0 à 6,4 µg/ml, ont été ensemencées sur milieu de Sabouraud. Une condition supplémentaire dans laquelle les arthrospores ont été ensemencées en présence de 6,4% de DMSO, correspondant au solvant de la concentration la plus élevée en miconazole, a permis de s'assurer que le solvant seul n'avait pas d'impact sur la croissance des arthrospores. Les boîtes de Sabouraud ont été incubées à 27°C pendant 7 jours et les UFC ont été dénombrées afin de calculer le pourcentage de croissance des arthrospores de *T. rubrum* (Figure 13 A).

Le pourcentage de croissance des arthrospores de *T. rubrum* est de 100 % en absence de miconazole et n'est pas affecté par le DMSO. Par contre on observe que plus la concentration en miconazole est élevée, plus le pourcentage de croissance diminue jusqu'à atteindre une valeur nulle à partir d'une concentration de 3,2 µg/ml de miconazole. Une concentration de 3,2 µg/ml de miconazole est donc suffisante pour inhiber la croissance des arthrospores de *T. rubrum* et correspond à la concentration minimum inhibitrice.

Un test de survie a confirmé que le miconazole à une concentration de 3,2 µg/ml n'avait pas d'impact sur la survie des RHE (Figure 13 B).

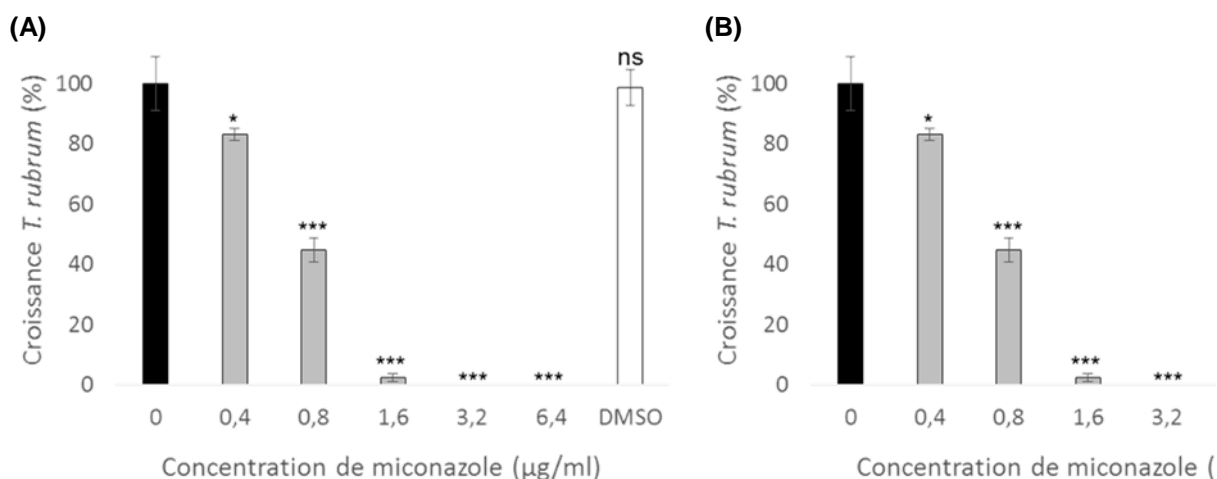


Figure 13 : (A) Pourcentage d'arthrospores ayant formé des colonies après 7 jours à 27°C sur milieu de Sabouraud en présence de différentes concentrations de miconazole ou en présence de DMSO par rapport aux arthrospores en absence de miconazole ($n=3 \pm SD$; * $p<0,05$ *** $p<0,001$; t Student). (B) Pourcentage de survie des RHE après 4 heures d'incubation en présence de 3,2 µg/ml de miconazole ou de 3,2 % de DMSO par rapport à des RHE contrôles non-traités ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0,05$; t Student).

L'effet inhibiteur du miconazole à une concentration de 3,2 µg/ml a été vérifié en utilisant le modèle de dermatophytose sur RHE. Deux procédures expérimentales ont été menées. Dans la première, le miconazole a été appliqué de manière topique sur les RHE en même temps que les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894. Dans la seconde procédure, le miconazole a été appliqué sur les épidermes infectés un jour après leur inoculation (comme établi dans le protocole d'infection, les RHE avaient subi les rinçages au PBS quatre heures après l'inoculation). Dans les deux cas, les RHE ont été réexposés à l'interface air-liquide quatre heures après application du miconazole. Quatre jours après l'inoculation, ces épidermes infectés en présence de miconazole ont été récupérés. D'une part un marquage par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase a été réalisé (**Figure 14 A**) et, d'autre part, l'ADN total a été extrait afin de déterminer le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* par PCR quantitative (**Figure 14 B**). Ces résultats ont été comparés à ceux d'un épiderme infecté en absence de miconazole.

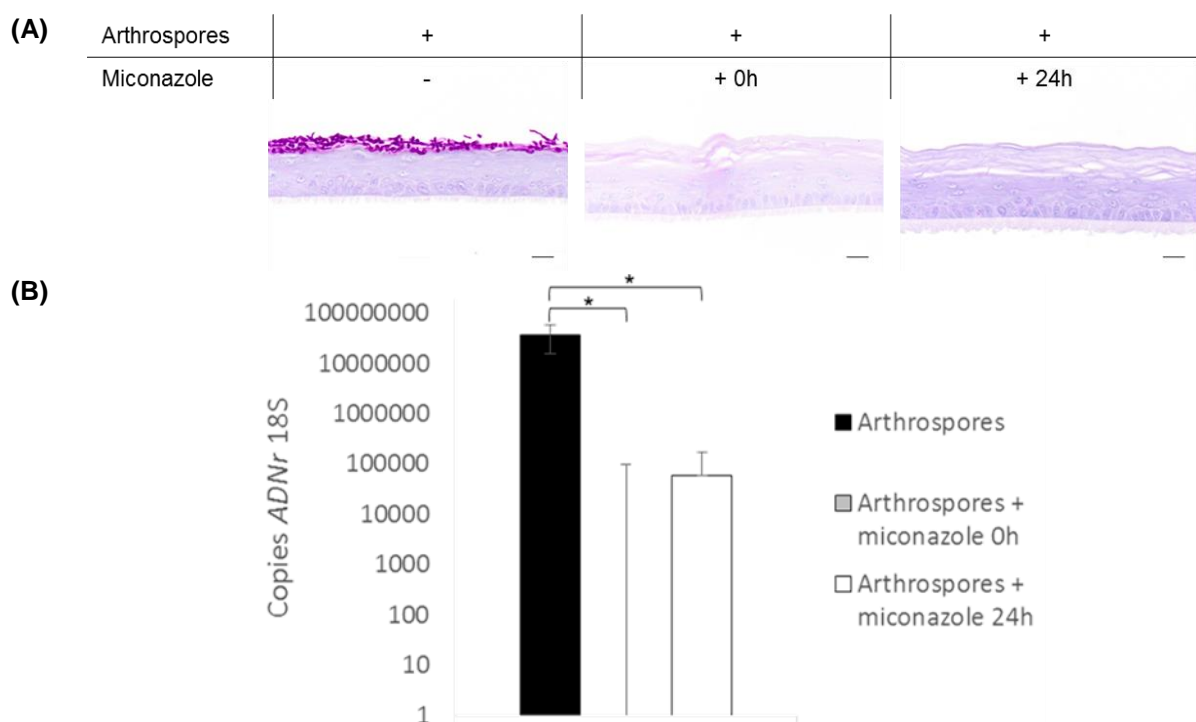


Figure 14 : (A) Marquage au PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE quatre jours après inoculation par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 seules ou en présence de 3,2 µg/ml de miconazole appliqué en même temps ou 24h après l'inoculation. Barres d'échelle : 20 µm. (B) Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* quatre jours après l'inoculation des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* seules ou en présence de 3,2 µg/ml de miconazole appliqué en même temps ou 24h après l'inoculation (n=3 \pm SD; *p<0,05; t Student).

Dans les deux procédures expérimentales, le miconazole a effectivement inhibé l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum*. En effet, le marquage par le PAS révèle une absence d'éléments fongiques dans la couche cornée des épidermes infectés en présence de miconazole. De même, le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* est drastiquement réduit en présence de miconazole ; les quelques copies d'ADNr 18S de *T. rubrum* détectée en présence de miconazole correspondant probablement aux éléments morts restés en surface des épidermes.

Un test supplémentaire a été réalisé pour évaluer l'efficacité du miconazole sur des RHE préalablement infectés. Le miconazole, à une concentration de 3,2 µg/ml, a ainsi été appliqué topiquement sur les RHE quatre jours après leur inoculation par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de $1,7 \times 10^3$ / cm². L'application du miconazole a ensuite été répétée chaque jour jusqu'au septième jour suivant l'inoculation et les RHE ont été réexposés à l'interface air-liquide 4 heures après chaque application de miconazole. Au huitième jour après l'inoculation, les épidermes infectés ont été récupérés. Le niveau d'invasion de la couche cornée et le taux d'infection ont alors été analysés respectivement par marquage au PAS avec prétraitement à l' α -amylase (**Figure 15 A**) et par PCR quantitative (**Figure 15 B**) et comparés par rapport à un épiderme infecté mais non-traité au miconazole. Ces résultats montrent que le miconazole, appliqué quatre jours après l'inoculation des RHE par les arthrospores de *T. rubrum*, a permis de limiter l'infection fongique.

En conclusion, le modèle de dermatophytose mis au point sur RHE est un outil valide pour tester l'efficacité d'agents antifongiques.

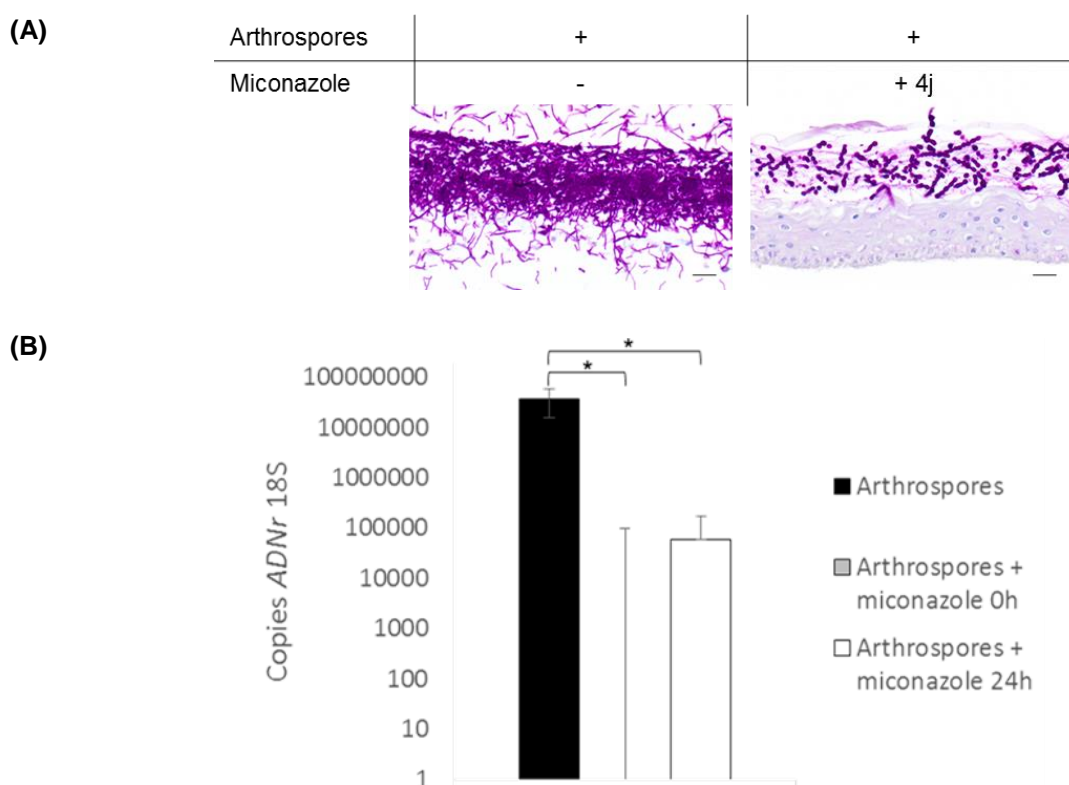


Figure 15 : (A) Marquage au PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE huit jours après inoculation par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 seules ou en présence de 3,2 µg/ml de miconazole appliqué 4 jours après l'inoculation. Barres d'échelle : 20 µm. **(B)** Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* huit jours après l'inoculation des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* seules ou en présence de 3,2 µg/ml de miconazole appliqué 4 jours après l'inoculation (n=3 ± SD; **p<0,01; t Student).

2. Tests de stabilité et d'efficacité des peptides inhibiteurs in vitro

La stabilité d'un peptide inhibiteur désigne la capacité du peptide à rester stable et donc conserver son pouvoir inhibiteur lorsqu'il est en contact avec d'une part les éléments fongiques (arthrospores de différents dermatophytes), et d'autre part l'épiderme (représenté par les épidermes humains reconstruits et les explants cutanés d'oreilles de cochon).

L'efficacité d'un peptide inhibiteur désigne sa capacité à diminuer l'adhérence des arthrospores à l'épiderme.

2.1. Stabilité des peptides inhibiteurs au contact des épidermes humains reconstruits

La capacité du propeptide de Sub 3 ainsi que du peptide VIP, du peptide 13 et du peptide 2d à conserver leur pouvoir inhibiteur de Sub 3 au contact des épidermes humains reconstruits a été évaluée par le test d'activité utilisant le substrat synthétique AAPF-pNa.

Les peptides étudiés sur le modèle de dermatophytose sur RHE sont listés à la **Table 1**. Pour des raisons de confidentialité, les séquences de ces peptides ne seront pas montrées ici.

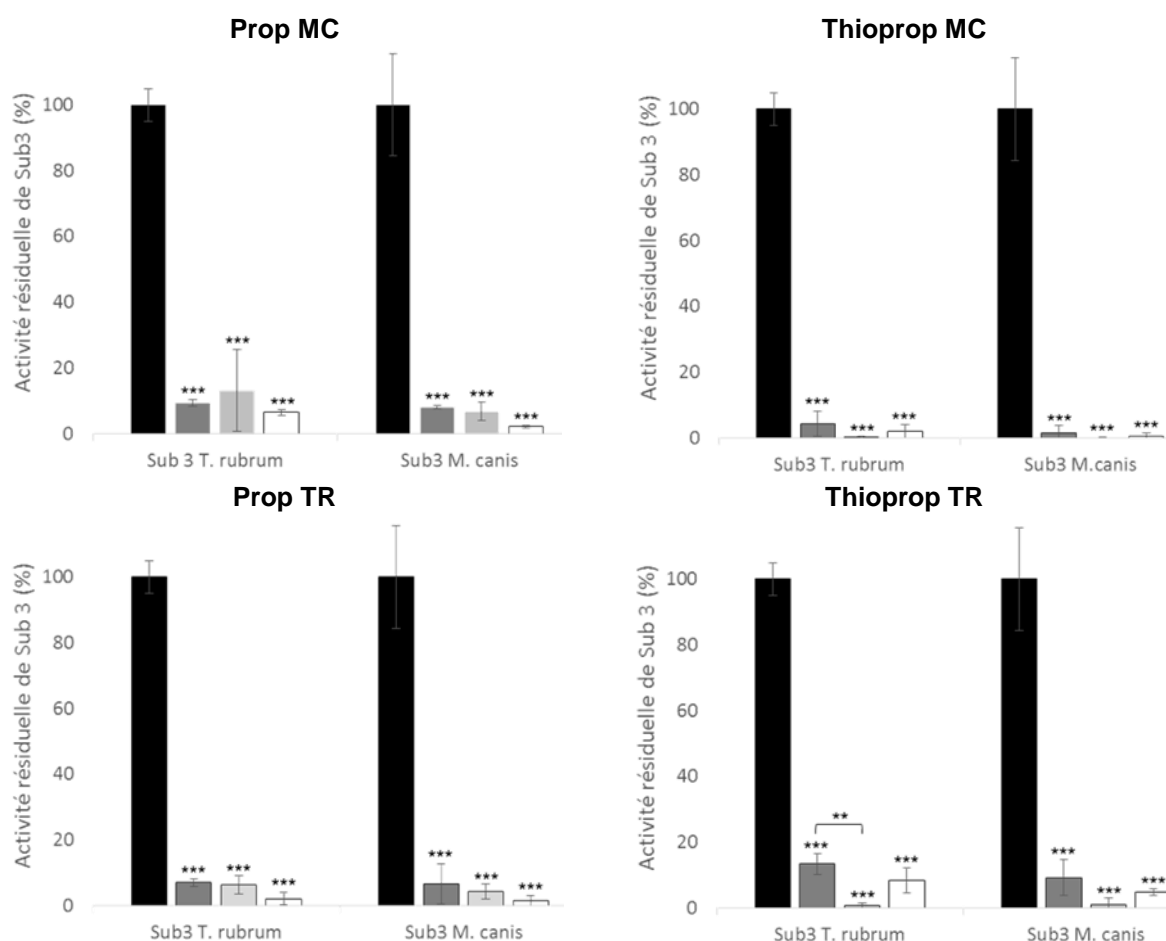
Table 1 : Liste des peptides étudiés sur le modèle de dermatophytose sur RHE		
	(Abréviation)	Concentration testées
Propeptide de Sub 3 de <i>M. canis</i>	(Prop MC)	2 µM
Propeptide de Sub3 de <i>M. canis</i> en fusion à la thiorédoxine	(Thioprop MC)	2 µM
Propeptide de Sub 3 de <i>T. rubrum</i>	(Prop TR)	2 µM
Propeptide de Sub3 de <i>T. rubrum</i> en fusion à la thiorédoxine	(Thioprop TR)	2 µM
Peptide VIP		300 µM
Peptide 13		15 µM
Peptide 2d		40 µM et 80 µM

En pratique, les différentes formes du propeptide, ainsi que les différents peptides étudiés, sont utilisés directement après leur sortie du congélateur (condition optimale) pour évaluer leur effet inhibiteur de Sub 3. Afin de vérifier que le contact avec les épidermes reconstruits n'interfère pas avec la capacité inhibitrice de ces peptides, ceux-ci sont appliqués de manière topique sur les RHE et incubés pendant 4 heures à 37°C. Ils sont ensuite récupérés et mis en présence de la protéase Sub 3 recombinante (0,55 µM) de *T. rubrum* ou de *M. canis* et de son substrat AAPF-pNa (1 mM). L'activité résiduelle de Sub 3 est alors déterminée par mesure de l'absorbance à 405 nm 5 minutes après l'ajout du substrat (**Figure 16**). Une condition supplémentaire a consisté en l'incubation préalable des peptides à 37°C pendant 4 heures pour s'assurer que la température à elle seule n'avait pas d'impact sur leur pouvoir inhibiteur.

L'activité enzymatique de la protéase Sub 3 recombinante de *T. rubrum*, ou de *M. canis*, seule est considérée comme 100%.

Les propeptides de Sub 3 de *T. rubrum* et *M. canis*, en fusion ou non à la thiorédoxine, inhibent l'activité de Sub 3 à plus de 80% ; en effet l'activité résiduelle de Sub 3 se situe sous les 20% en présence de ces propeptides en condition optimale. Le pouvoir inhibiteur de ces différentes formes du propeptide de Sub 3 est conservé après 4 heures d'incubation à 37°C et après 4 heures d'incubation sur RHE à 37°C.

Le pouvoir inhibiteur du peptide VIP n'a été testé que sur la Sub 3 de *T. rubrum*. L'activité résiduelle de Sub 3 en présence du peptide VIP en condition optimale est de 38%, ce qui signifie que le peptide VIP inhibe effectivement la Sub 3 mais de manière moins importante que le propeptide. Après incubation à 37°C ou sur RHE, le peptide VIP conserve sa capacité inhibitrice de Sub 3.



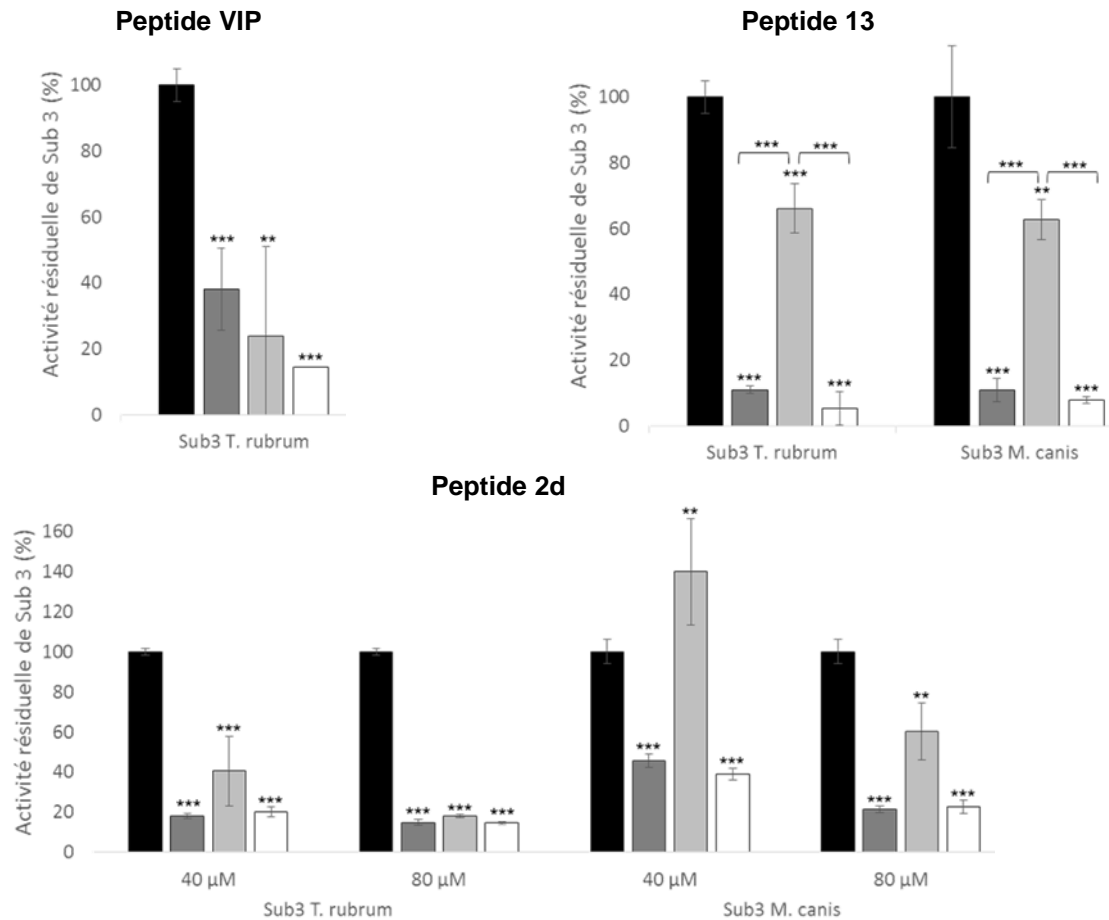


Figure 16 : Activité résiduelle de la protéase Sub 3 de *T. rubrum* ou *M. canis* seule (noir), en présence du peptide en condition optimale (gris foncé), en présence du peptide après incubation 4 ehures à 37°C sur RHE (gris clair) ou en présence du peptide après 4 heures d'incubation à 37°C (blanc) (n=3 \pm SD; **p<0,01 ***p<0,001; ANOVA1).

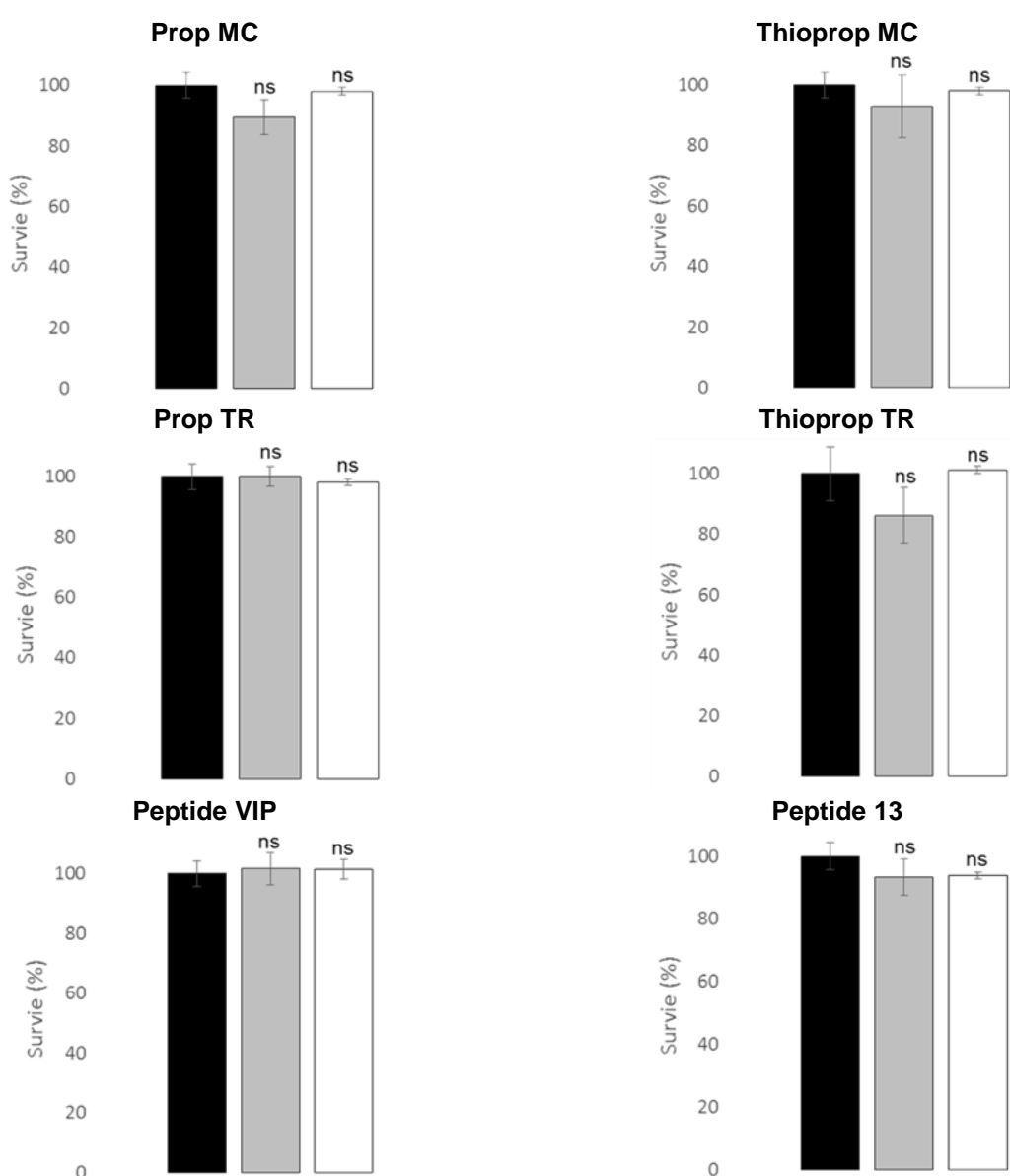
Le peptide 13 inhibe l'activité de Sub 3 de *T. rubrum* et de *M. canis* à près de 90% : l'activité résiduelle de Sub 3 se situe à environ 10% en présence du peptide 13 en condition optimale. L'inhibition de l'activité de Sub 3 par le peptide 13 est maintenue après que le peptide ait été incubé à 37°C pendant 4 heures. Par contre, en présence du peptide 13 après incubation sur RHE, l'activité résiduelle de Sub 3 remonte aux alentours des 60%. Ceci pourrait être expliqué par une mauvaise récupération du peptide 13 qui resterait en partie « attaché » en surface des RHE et ne serait donc pas ajouté au milieu réactionnel en présence de Sub 3 et du substrat.

Enfin, le peptide 2d inhibe l'activité de Sub 3 de *T. rubrum* à plus de 80% et conserve son pouvoir inhibiteur après incubation à 37°C ou sur RHE, l'inhibition de Sub 3 étant plus importante lorsque le peptide 2d est utilisé à une concentration de 80 μ M. Le peptide 2d inhibe également l'activité de Sub 3 de *M. canis* de manière moins efficace.

2.2. Effet des peptides inhibiteurs sur la survie des RHE

Un test de survie a été effectué pour évaluer la toxicité potentielle des peptides inhibiteurs sur les épidermes reconstruits. Pratiquement, les différentes peptides inhibiteurs, ou en contrôle leur solvant (DMSO 3,4 % dans PBS pour le peptide VIP et PBS seul pour les autres peptides), ont été appliqués de manière topique sur les RHE et incubés pendant 4 heures à 37°C. Les RHE ont alors été soumis à un test MTT et le pourcentage de survie par rapport à un épiderme contrôle non-traité a été calculé (**Figure 17**).

Les résultats montrent qu'aucun des peptides utilisés n'a d'impact significatif sur la survie des RHE.



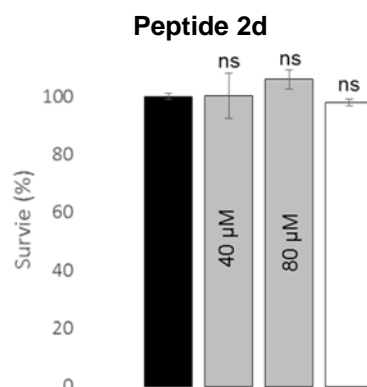


Figure 17 : Pourcentage de survie des RHE après 4 heures d'incubation en présence des différents peptides inhibiteurs (gris) ou de leur solvant (blanc) par rapport à des RHE contrôles non-traités (noir) ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0,05$; t Student).

2.3. Efficacité des peptides sur l'infection des épidermes humains reconstruits

L'effet des peptides inhibiteurs de Sub 3 sur le développement de l'infection par les arthrospores de *T. rubrum* dans les RHE a été évalué. Pour ce faire, les RHE ont été inoculés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 seules (contrôle) ou en présence des différents peptides inhibiteurs. Le pourcentage d'adhérence des arthrospores, l'invasion de la couche cornée et le taux d'infection ont été déterminés respectivement par dénombrement des UFC formée à partir des arthrospores non-adhérentes (paragraphe 1.6.), par marquage au PAS et par PCR quantitative (paragraphe 1.4.).

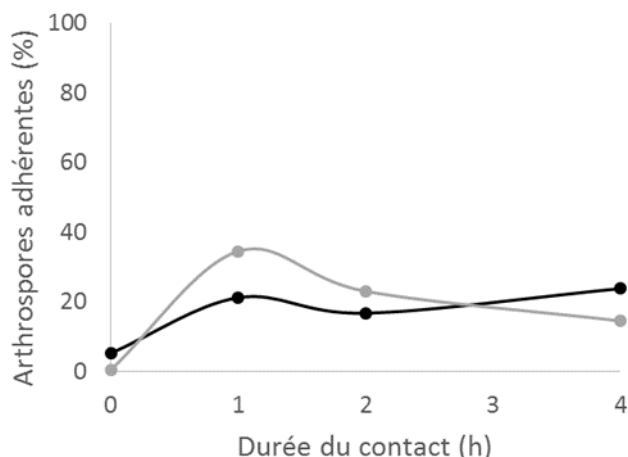
2.3.1. Peptide VIP

Les RHE ont été inoculés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de $1,7 \times 10^3$ /cm² seules (contrôle) ou en présence de 300 µM de peptide VIP. Les arthrospores non-adhérentes ont été récupérées par des rinçages au PBS réalisés immédiatement (0h), 1, 2 ou 4 heures après l'inoculation etensemencées sur des boîtes de Sabouraud. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les UFC ont été dénombrées et le pourcentage d'adhérence a pu être calculé (**Figure 18 A**). En parallèle, les épidermes infectés ont été maintenus en culture et récupérés au terme de quatre jours pour subir un marquage par le PAS (**Figure 18 B**). Pour l'analyse morphologique, seules les RHE infectés qui ont été rincés après 4 heures sont montrés, les résultats étant similaires pour les RHE rincés après 1 et 2 heures.

Le pourcentage d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* au RHE n'est pas diminué en présence du peptide VIP. De même, les marquages histochimiques montrent que les arthrospores de *T. rubrum* ont colonisé la couche cornée des RHE de façon similaire indépendamment de la présence du peptide VIP.

Ces résultats semblent indiquer que le peptide VIP ne permet pas d'inhiber, ni même de diminuer, l'infection des épidermes. Devant cette conclusion décevante, les tests sur le peptide VIP n'ont pas été répétés, et d'autres peptides inhibiteurs, plus prometteurs, ont été investigués.

(A)



(B)

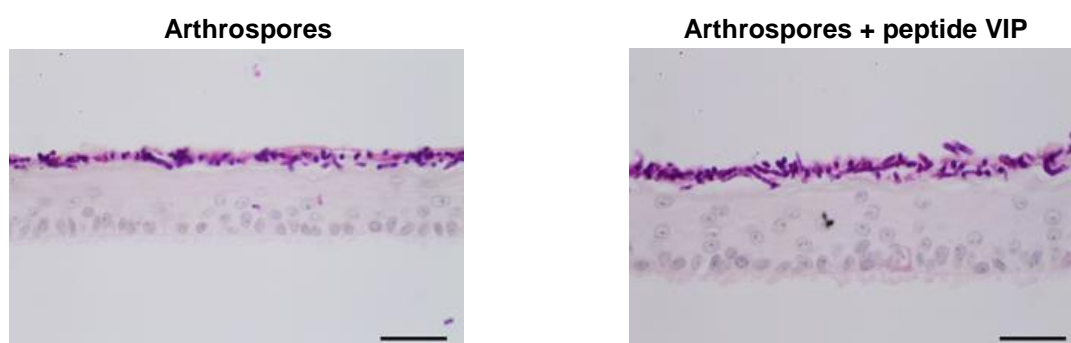
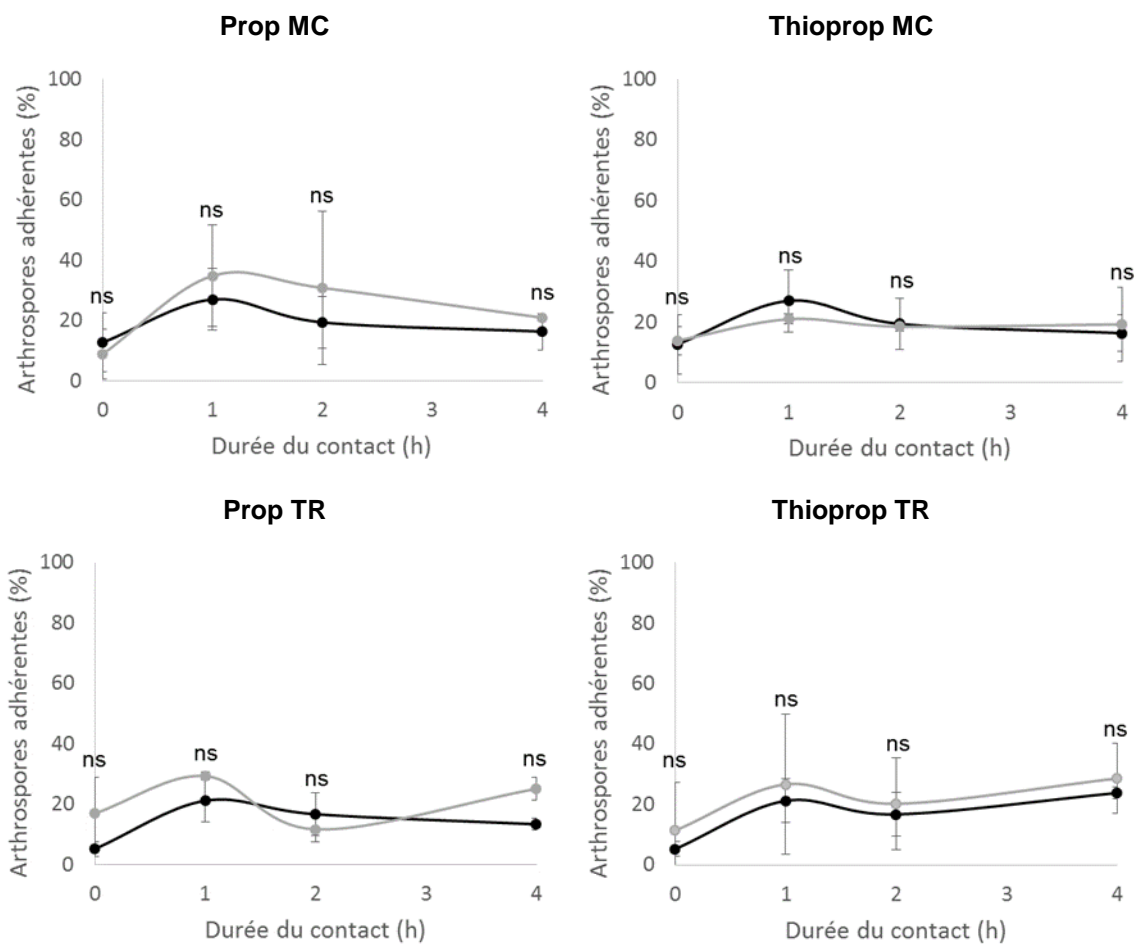


Figure 18 : (A) Cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 aux RHE en présence (gris) ou non (noir) du peptide VIP (n=1). (B) Marquage par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE infectés par les arthrospores de *T. rubrum* en présence ou non du peptide VIP, et rincés après 4 heures. Barres d'échelles : 50 μ m.

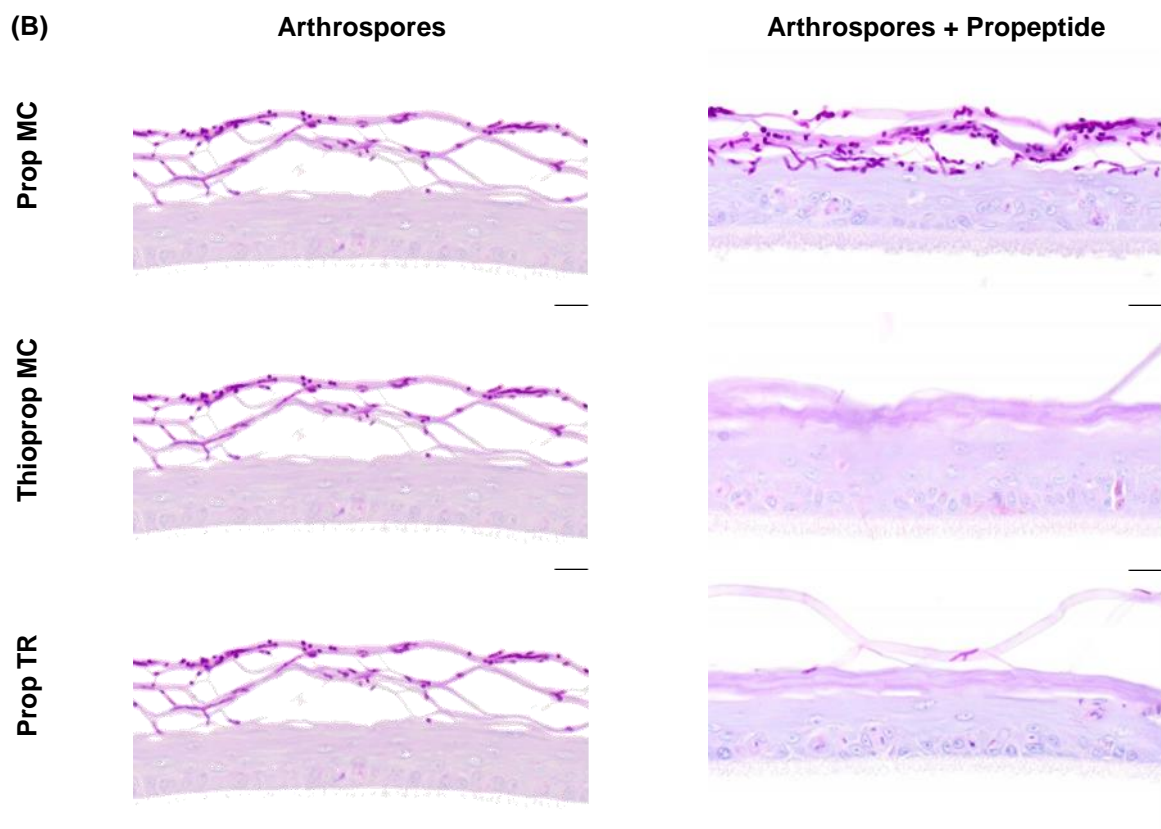
2.3.2. Propeptide de Sub3

Les RHE ont été inoculés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de $1,7 \times 10^3$ /cm² seules (contrôle) ou en présence de 2 μ M du propeptide de *T. rubrum* ou de *M. canis* en fusion ou non à la thiorédoxine. Les arthrospores non-adhérentes ont été récupérées par des rinçages au PBS réalisés 0, 1, 2 ou 4 heures après l'inoculation etensemencées sur des boîtes de Sabouraud. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les UFC ont été dénombrées et le pourcentage d'adhérence a pu être calculé (**Figure 19 A**). En parallèle, les épidermes infectés par les arthrospores de *T. rubrum* en présence ou non des différentes formes du propeptide ont été maintenus en culture et récupérés au terme de quatre jours. Un marquage par le PAS a alors été réalisé (**Figure 19 B**) ; seuls les RHE infectés qui ont été rincés après 4 heures sont montrés, les résultats étant similaires pour les RHE rincés après 1 et 2 heures.

(A)



(B)



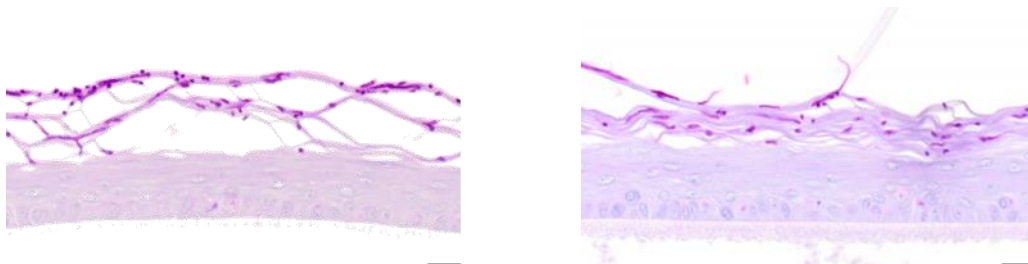


Figure 19 : (A) Cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 aux RHE en présence (gris) ou non (noir) des différentes formes du propeptide de Sub 3 ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0,05$; t Student). (B) Marquage par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE infectés par les arthrospores de *T. rubrum* en présence ou non des différentes formes de propeptide, et rincés après 4 heures. Barres d'échelles : 20 μ m.

Les résultats montrent que le pourcentage d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE n'est pas modifié par la présence des différentes formes du propeptide de Sub 3. Il semble pourtant que la présence du Thioprop MC, du Prop TR et du Thioprop TR permet de diminuer le niveau d'invasion des épidermes visible quatre jours après l'inoculation. Pour expliquer cette contradiction, il faut garder à l'esprit que le pourcentage d'adhérence est calculé sur base des arthrospores non-adhérentes récupérées. Il se pourrait que l'étape de rinçage ne soit pas optimale et qu'une partie des arthrospores non-adhérentes ne soient pas récupérées et restent en surface du RHE où elles ont alors tout le temps d'adhérer et d'envahir le tissu (voir paragraphe 1.6.). Un autre aspect important à ne pas oublier est que les marquages histochimiques ne sont pas quantitatifs, de plus il apparaît que l'infection ne se développe pas de manière homogène sur toute la surface des RHE. Il est dès lors risqué de se baser uniquement sur les résultats d'un tel marquage pour conclure à un effet d'inhibition de l'infection par le propeptide de Sub 3.

Pour compléter ces résultats, une analyse quantitative de l'infection a été réalisée. Les RHE ont été inoculés avec les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 en présence du Thioprop TR et les rinçages au PBS ont été effectués après 4 heures. Quatre jours après l'inoculation, l'ADN total a été extrait de ces RHE et le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* a été déterminé par PCR quantitative (**Figure 20**). Afin de se rapprocher au mieux des conditions d'infection *in vivo* (voir paragraphe 1.5.), différentes taille d'inoculum ont été testées : $1,7 \times 10^3$, $4,25 \times 10^2$ et $2,12 \times 10^2$ arthrospores / cm^2 .

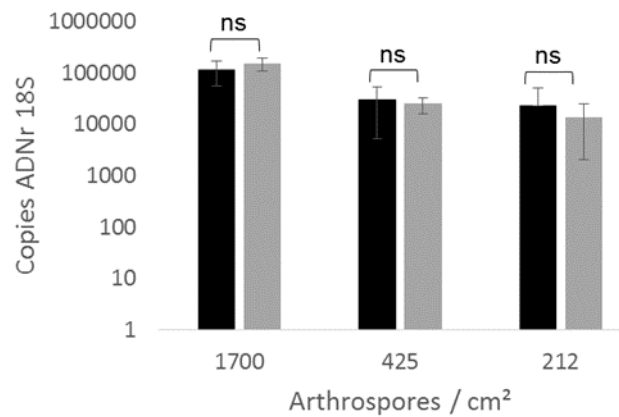


Figure 20 : Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* quatre jours après l'inoculation des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de $1,7 \times 10^3$, $4,25 \times 10^2$ ou $2,12 \times 10^2$ / cm² en présence (gris) ou non (noir) du Thioprop TR ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0,05$; t Student).

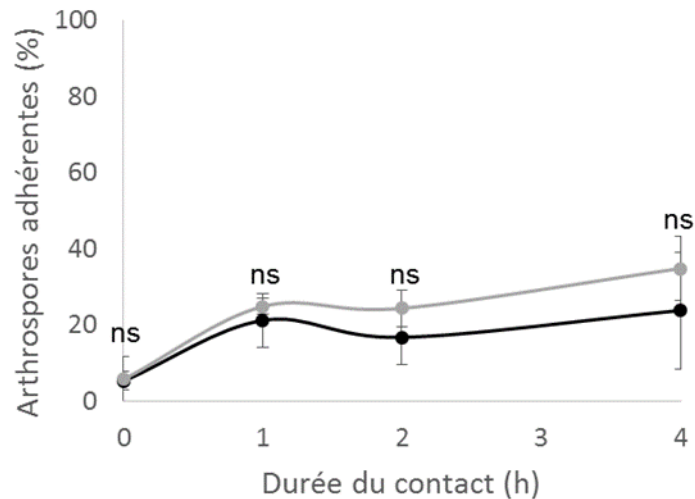
Les résultats montrent que le taux d'infection des épidermes par les arthrospores de *T. rubrum* n'est pas modifié en présence du Thioprop TR, quelle que soit la taille de l'inoculum. Il semblerait donc que le propeptide de *T. rubrum* en fusion à la thiorédoxine, bien qu'il inhibe Sub 3, ne soit pas suffisant pour empêcher l'invasion de l'épiderme par les arthrospores de *T. rubrum*.

2.3.3. Peptide 13

Les RHE ont été inoculés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de $1,7 \times 10^3$ /cm² seules (contrôle) ou en présence de 15 μ M du peptide 13. Les arthrospores non-adhérentes ont été récupérées par des rinçages au PBS réalisés 0, 1, 2 ou 4 heures après l'inoculation etensemencées sur des boîtes de Sabouraud. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les UFC ont été dénombrées et le pourcentage d'adhérence a pu être calculé (**Figure 21 A**). En parallèle, les épidermes infectés par les arthrospores de *T. rubrum* en présence ou non du peptide 13 ont été maintenus en culture et récupérés au terme de quatre jours. Un marquage par le PAS a alors été réalisé (**Figure 21 B**). Seuls les marquages des RHE infectés qui ont été rincés après 4 heures sont montrés, les résultats étant similaires lorsque les RHE ont été rincés après 1 et 2 heures.

Les résultats montrent que le pourcentage d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE n'est pas modifié par la présence du peptide 13. Néanmoins, le niveau d'invasion des épidermes, visible quatre jours après l'inoculation, apparait réduit en présence du peptide 13.

(A)



(B)

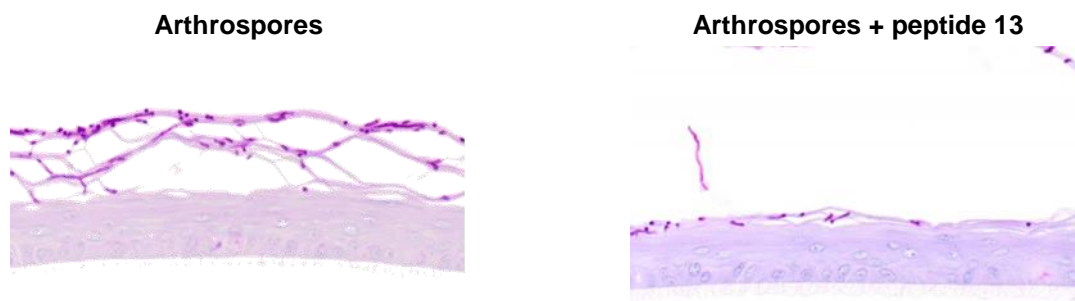


Figure 21 : (A) Cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 aux RHE en présence (gris) ou non (noir) du peptide 13 ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0,05$; t Student). (B) Marquage par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE infectés par les arthrospores de *T. rubrum* en présence ou non du peptide 13, et rincés après 4 heures. Barres d'échelles : 20 μm .

Pour compléter ces résultats, une analyse quantitative de l'infection a été réalisée. Les RHE ont été inoculés avec les arthrospores de *T. rubrum* en présence du peptide 13 et les rinçages au PBS ont été effectués après 4 heures. Quatre jours après l'inoculation, l'ADN total a été extrait de ces RHE et le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* a été déterminé par PCR quantitative (**Figure 22**). Afin de se rapprocher au mieux des conditions d'infection *in vivo* (voir paragraphe 1.5.), différentes taille d'inoculum ont été testées : $1,7 \times 10^3$, $4,25 \times 10^2$ et $2,12 \times 10^2$ arthrospores / cm^2 .

Les résultats montrent que le taux d'infection des épidermes par les arthrospores de *T. rubrum* n'est pas modifié en présence du peptide 13, quelle que soit la taille de l'inoculum. Il semblerait donc que le peptide 13, bien qu'il inhibe Sub 3, ne soit pas suffisant pour empêcher l'invasion de l'épiderme par les arthrospores de *T. rubrum*.

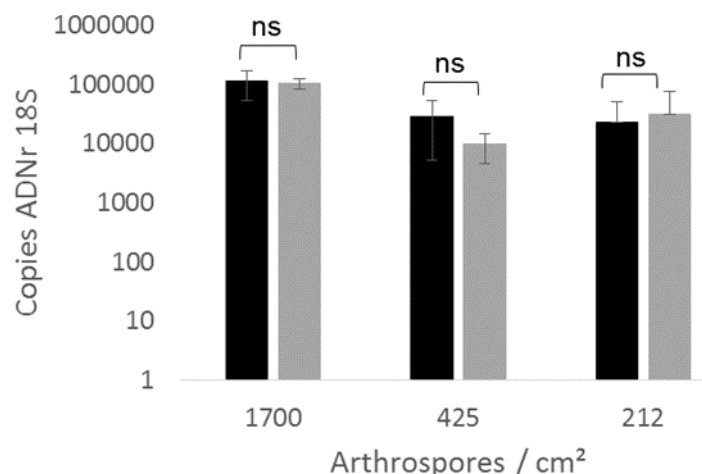


Figure 22 : Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* quatre jours après l'inoculation des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de $1,7 \times 10^3$, $4,25 \times 10^2$ ou $2,12 \times 10^2$ / cm² en présence (gris) ou non (noir) du peptide 13 ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0,05$; t Student).

2.3.4. Peptide 2d

Les RHE ont été inoculés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de $1,7 \times 10^3$ / cm² seules (contrôle) ou en présence de 40 µM ou 80 µM du peptide 2d. Les arthrospores non-adhérentes ont été récupérées par des rinçages au PBS réalisés 1, 2 ou 4 heures après l'inoculation et ensemencées sur des boîtes de Sabouraud. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les UFC ont été dénombrées et le pourcentage d'adhérence a pu être calculé (**Figure 23 A**). En parallèle, les épidermes infectés par les arthrospores de *T. rubrum* en présence ou non du peptide 2d ont été maintenus en culture et récupérés au terme de quatre jours. L'ADN a alors été extrait de ces épidermes dans le but de quantifier le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* (**Figure 23 B**). Un marquage par le PAS a également été réalisé (**Figure 23 C**). Pour le marquage, seuls les RHE infectés qui ont été rincés après 4 heures sont montrés, les résultats étant similaires pour les RHE rincés après 1 et 2 heures.

Le pourcentage d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE semble réduit après 2h en présence du peptide 2d bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative. Le taux d'infection des RHE, déterminé par PCR quantitative au quatrième jour d'infection, est quant à lui statistiquement diminué en présence de 80 µM de peptide 2d lorsque les rinçages ont été effectués 2h après l'inoculation. De plus, bien que les marquages histochimiques ne soient pas quantitatifs, l'invasion des épidermes quatre jours après l'inoculation apparaît légèrement moins étendue en présence du peptide 2d à 40 µM et 80 µM.

Le peptide 2d semble prometteur et les tests ont été répétés en diminuant la taille de l'inoculum afin de se rapprocher des conditions d'infection *in vivo*.

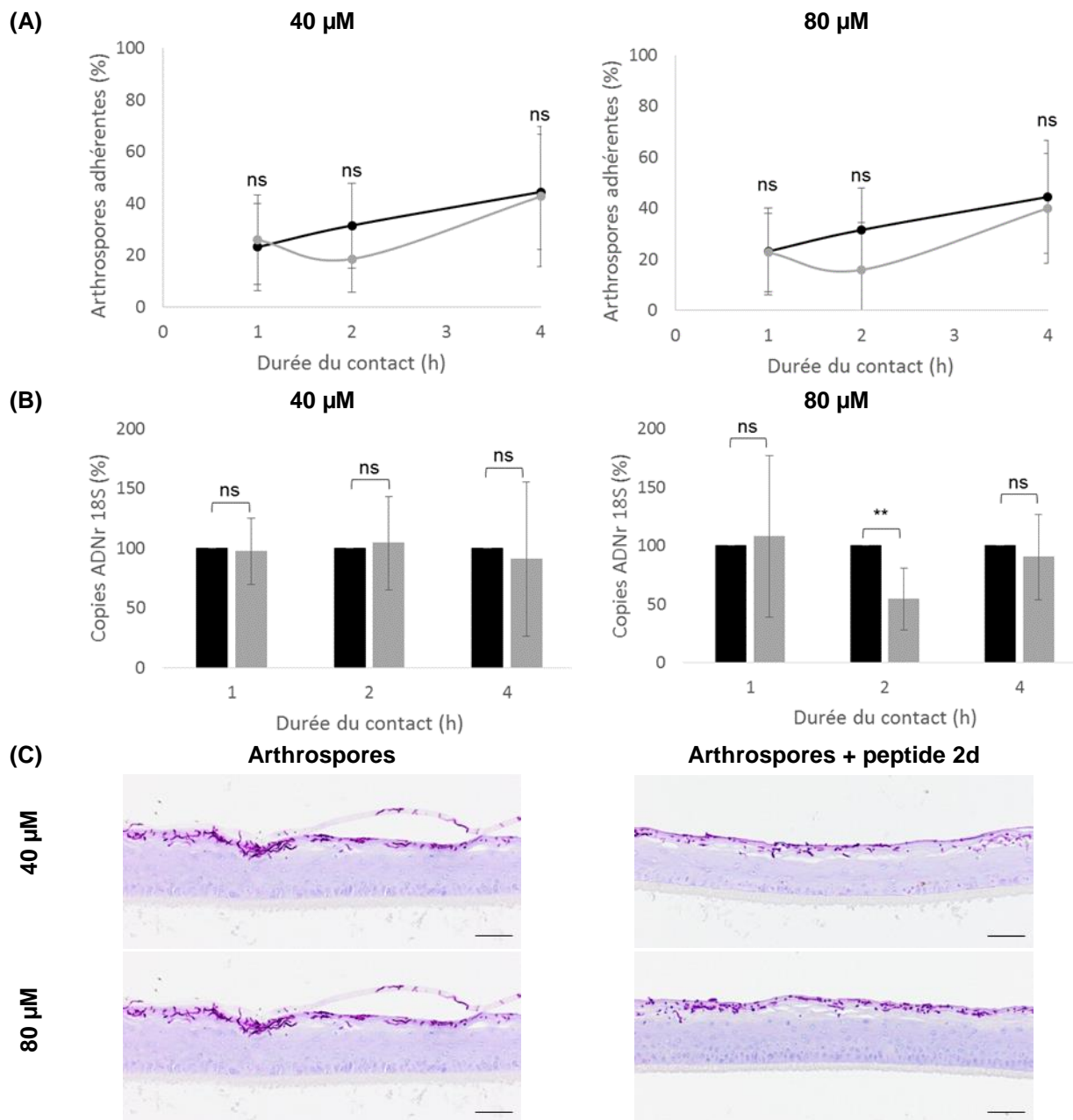


Figure 23 : **(A)** Cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 au RHE en présence (gris) ou non (noir) du peptide 2d à une concentration de 40 μ M ou 80 μ M ($n=3 \pm SD$; $^{ns}p \geq 0,05$; t Student). **(B)** Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* quatre jours après l'inoculation des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* en présence (gris) ou non (noir) du peptide 2d à des concentrations de 40 μ M ou 80 μ M. Les rinçages ont été effectués après 1, 2 ou 4h. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de copies de l'ADNr 18S détectés en présence du peptide 2d par rapport au nombre de copies de l'ADNr 18S détectées en absence du peptide 2d ($n=3 \pm SD$; $^{**}p < 0,01$ $^{ns}p \geq 0,05$; t Student). **(C)** Marquage par le PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalun des RHE infectés par les arthrospores de *T. rubrum* en présence ou non du peptide 2d à une concentration de 40 μ M ou 80 μ M, et rincés après 4 heures. Barres d'échelles : 50 μ m.

Les RHE ont été inoculés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 à une densité de $4,25 \times 10^2$ / cm² seules (contrôle) ou en présence de 40 µM ou 80 µM du peptide 2d. Les arthrospores non-adhérentes ont été récupérées par des rinçages au PBS réalisés 1, 2 ou 4 heures après l'inoculation et ensemencées sur des boîtes de Sabouraud. Après 7 jours d'incubation à 27°C, les UFC ont été dénombrées et le pourcentage d'adhérence a pu être calculé (**Figure 24 A**). En parallèle, les épidermes infectés ont été maintenus en culture et récupérés au terme de quatre jours. L'ADN a alors été extrait de ces épidermes dans le but de quantifier le nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* (**Figure 24 B**).

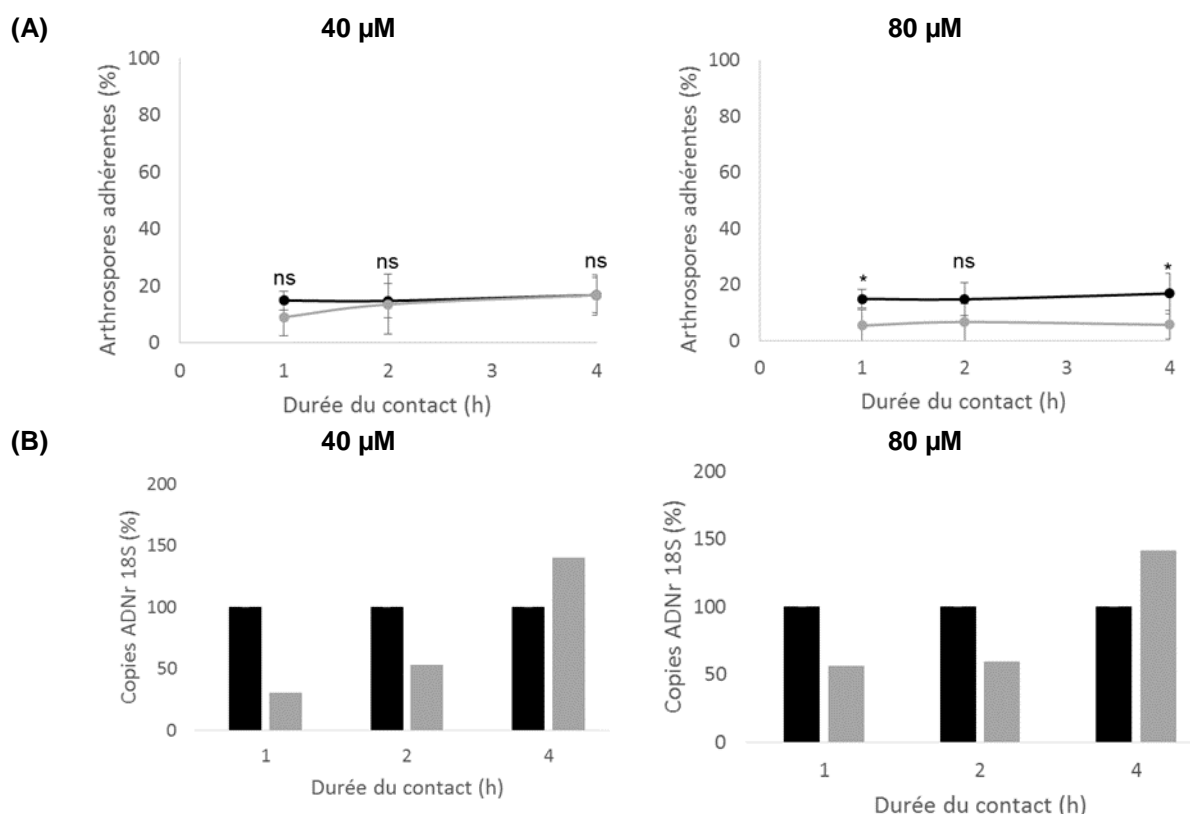


Figure 24 : **(A)** Cinétique d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* ensemencées à une densité de $4,25 \times 10^2$ / cm² au RHE en présence (gris) ou non (noir) du peptide 2d à une concentration de 40 µM ou 80 µM (n=3 ± SD ; *p<0,05 ns p≥0,05; t Student). **(B)** Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* quatre jours après l'inoculation des RHE par les arthrospores de *T. rubrum* à une densité de $4,25 \times 10^2$ / cm² en présence (gris) ou non (noir) du peptide 2d à des concentrations de 40 µM ou 80 µM. Les rinçages ont été effectués après 1, 2 ou 4h. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de copies de l'ADNr 18S détectés en présence du peptide 2d par rapport au nombre de copies de l'ADNr 18S détectées en absence du peptide 2d (n=2).

Les résultats montrent que la présence du peptide 2d à une concentration de 80 µM permet de réduire le pourcentage d'adhérence des arthrospores de *T. rubrum* aux RHE. De même, le taux d'infection des RHE, déterminé par PCR quantitative au quatrième jour d'infection, semble également diminué en présence du peptide 2d à des concentrations de 40 µM ou 80 µM lorsque les rinçages ont été effectués 1 ou 2 heures après l'inoculation.

En conclusion, le peptide 2d semble être efficace pour réduire l'adhérence précoce, et l'invasion successive, des arthrospores de *T. rubrum* aux épidermes reconstruits, et mériterait d'être investigué plus en profondeur. Entre autres, il serait intéressant de réappliquer le peptide 2d en surface des RHE après les rinçages. En effet, comme mentionné au paragraphe 1.6.,

l'étape de rinçage pourrait ne pas être optimale, des arthrospores non-adhérentes resteraient alors en surface des épidermes reconstruits alors que le peptide 2d serait éliminé. Une nouvelle application du peptide 2d après les rinçages permettrait donc potentiellement de réduire l'infection des RHE de manière plus importante. La taille de l'inoculum pourrait également être revue à la baisse : en effet, *in vivo* seules quelques arthrospores sont suffisantes pour induire de la dermatophytose chez les patients. Dans ce cas, une optimisation de la technique de quantification par PCR serait nécessaire pour rendre celle-ci plus sensible et permettre la détection de l'infection même lorsque celle-ci est très faible.

3. Tests de toxicité et d'efficacité des émulsions avec miconazole

Afin de valoriser les émulsions, la capacité du miconazole, incorporé dans les émulsions de paraffine et de silicone, à inhiber l'infection des épidermes humains reconstruits a été évaluée. Quatre formulations ont été testées :

- Emulsion de paraffine blanche
- Emulsion de silicone + 2% de miconazole
- Emulsion de silicone blanche
- Emulsion de paraffine + 2% de miconazole

Premièrement, un test de survie a été réalisé pour évaluer la toxicité éventuelle des émulsions blanches et avec miconazole sur la survie des RHE (**Figure 25**). Pour mimer une situation de traitement, les RHE ont été cultivés à partir du jour 0 pour une durée de quatre jours. Vingt-quatre heures après le début de la culture 200 µl des émulsions, blanches ou contenant 2% de miconazole, ont été appliqués de manière topique sur les RHE avant d'être éliminés 4 heures plus tard par des rinçages au PBS. L'application des émulsions et les rinçages ont été répétés deux fois supplémentaires au deuxième et troisième jour de culture. Au quatrième jour de culture, un test MTT a été réalisé. La même procédure a été réalisée avec du Daktarin®, contenant également 2% de miconazole. Un RHE ne subissant aucun traitement ni rinçage a servi de contrôle.

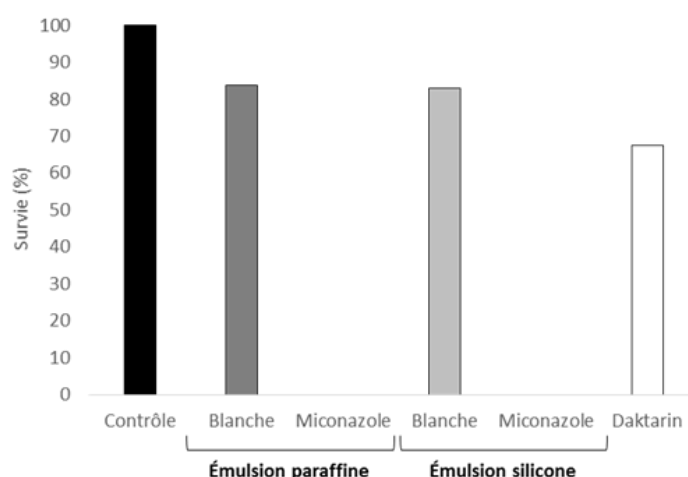


Figure 25 : Pourcentage de survie des RHE après traitement avec les émulsions de paraffine ou de silicone, blanches ou contenant 2% de miconazole, ou avec le Daktarin, en comparaison avec un épiderme contrôle non traité (n=1).

Les émulsions contenant 2% de miconazole ont démontré une forte toxicité cellulaire. Les émulsions avec miconazole ont donc été diluées avec les émulsions blanches correspondantes pour diminuer la concentration en miconazole. Un second test de survie a été réalisé, en suivant le même protocole que le premier test, pour évaluer la toxicité des émulsions contenant des concentrations de miconazole allant de 0,5% à 0,002% (**Figure 26**).

Les émulsions contenant des concentrations en miconazole égales ou inférieures à 0,1% n'impactent plus la survie des RHE de manière significative. Les émulsions contenant 0,1% de miconazole ont donc été produites et utilisées pour les tests d'efficacité sur RHE.

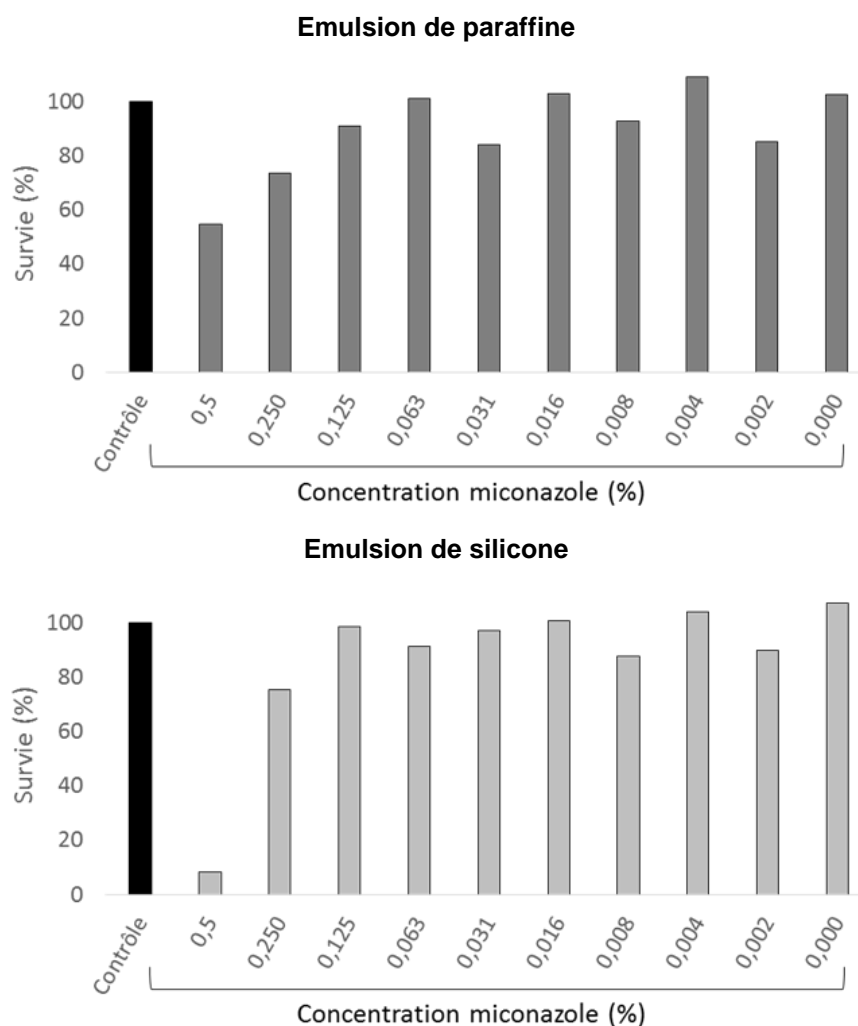
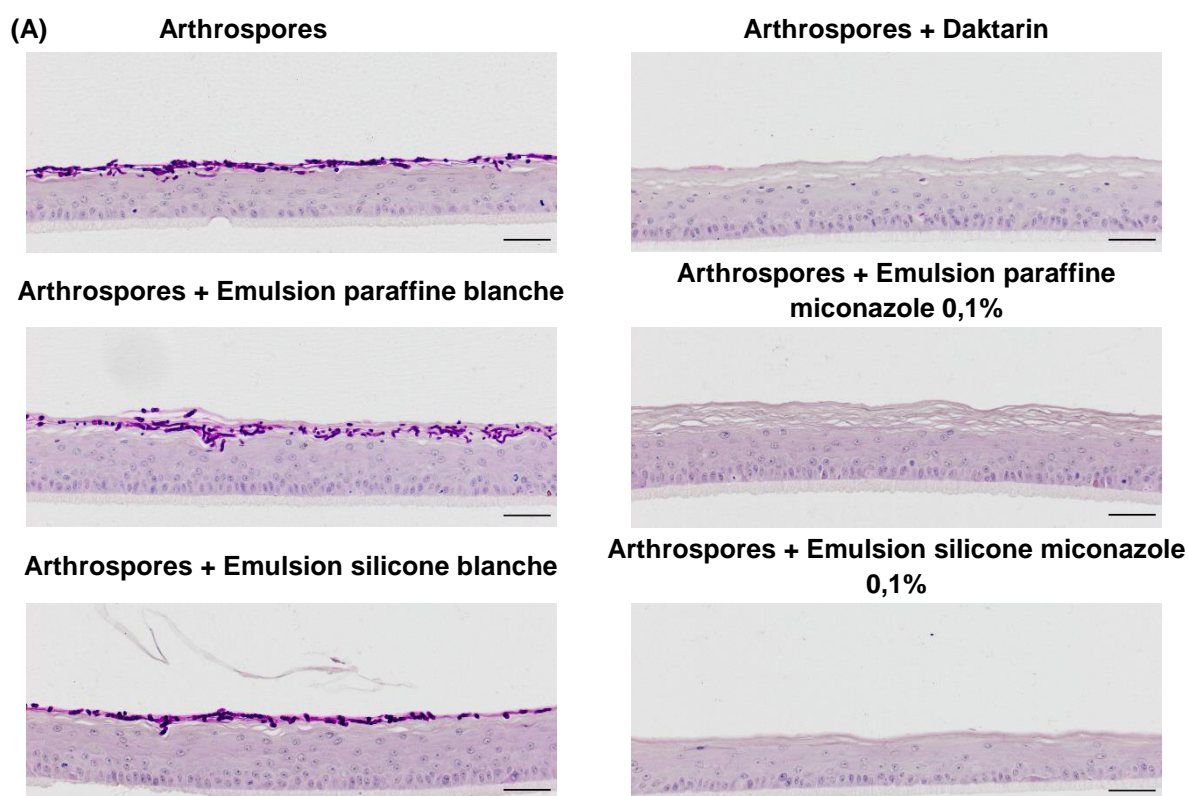


Figure 26 : Pourcentage de survie des RHE après traitement avec les émulsions de paraffine ou de silicone contenant des concentrations de miconazole de 0,5% à 0,002%, ou avec les émulsions blanches (0% de miconazole) en comparaison avec un épiderme contrôle non traité (n=1).

En pratique, les RHE ont été infectés par application topique des arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 en suspension dans 200 µl de PBS à une densité de $1,7 \times 10^3$ / cm². Après 4 heures, des rinçages au PBS ont été effectués afin d'éliminer les arthrospores non-adhérentes. Un jour après l'inoculation, 200 µl des émulsions blanches ou contenant 0,1% de miconazole ont été appliqués de manière topique sur les RHE. Quatre heures après l'application, les kératinocytes ont été réexposés au contact de l'air par élimination de l'émulsion restant en surface. L'application des émulsions et la mise à interface air-liquide ont été répétés deux fois supplémentaires au deuxième et troisième jour de culture. Au quatrième jour de culture, les épidermes infectés ont été récupérés et un marquage par le PAS (**Figure 27 A**) et une quantification de l'infection par PCR (**Figure 27 B**) ont été réalisés. Deux contrôles ont été utilisés : un RHE infecté et traité par le Daktarin© et un RHE infecté n'ayant subi aucun traitement.

Les résultats montrent que les émulsions de paraffine et de silicone contenant 0,1% de miconazole ont empêché l'infection des RHE par les arthrospores de *T. rubrum*. En effet, quatre jours après l'inoculation, aucun éléments fongique n'est détecté dans les épidermes, ni par marquage histochimique, ni par PCR quantitative.



(B)

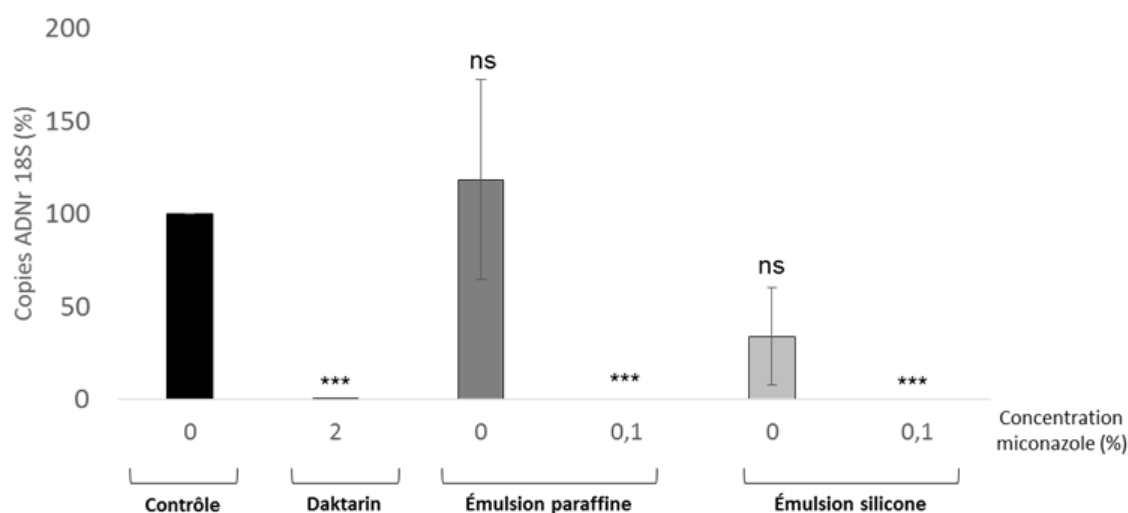


Figure 27 : (A) Marquage au PAS avec prétraitement à l' α -amylase et contre-coloration à l'hémalum des RHE infectés par les arthrospores de *T. rubrum* IHEM 13894 sans traitement, ou avec traitement par le Daktarin® ou par les émulsions silicones ou paraffine blanches ou contenant 0,1% de miconazole. Barres d'échelle : 50 μ m. **(B)** Quantification du nombre de copies de l'ADNr 18S de *T. rubrum* quatre jours après l'inoculation des RHE non traités (contrôles), ou traités avec le Daktarin®, ou avec les émulsions de paraffine ou de silicone blanche ou contenant 0,1% de miconazole ($n=3 \pm$ SD ; ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ $^{ns}p\geq 0,05$; t Student).

IV. Conclusion et perspectives

Les différentes stratégies envisagées pour développer un peptide inhibiteur ont permis d'obtenir plusieurs peptides inhibant l'activité de Sub 3 en plus des propeptides de *T. rubrum* et de *M. canis* en fusion ou non avec la thiorédoxine. Le peptide "VIP" obtenu après analyse bio-informatique des séquences des propeptides des protéases de type subtilisine a également été produit. La concentration en peptide VIP nécessaire pour inhiber Sub 3 est de 300 μ M et s'avère trop élevée pour pouvoir envisager l'utilisation de ce peptide dans notre produit final. De même, la concentration nécessaire des 4 peptides chevauchants d'intérêt pour inhiber Sub 3 étant de 100 μ M, l'utilisation du propeptide entier, en fusion ou non avec la thiorédoxine, semble plus appropriée. La technique du phage display a permis d'obtenir un peptide inhibiteur supplémentaire. Ce peptide de 13 acides aminés (appelé peptide 13), utilisé à des concentrations de 10 à 15 μ M, inhibe l'activité de Sub3 à plus de 90% et démontre une stabilité importante dans le temps dans différentes conditions de stockage. Les tests de stabilité du thiorédoxine-propeptide et du peptide 13 montrent qu'ils ne sont pas dégradés en présence des arthrospores de *T. rubrum*. De plus, les tests *in vitro* réalisés sur RHE démontrent que ces 2 peptides conservent leur pouvoir inhibiteur au contact des épidermes humains et n'interfèrent pas avec la viabilité des épidermes reconstruits. Cependant, les tests d'efficacité réalisés sur ce modèle, ainsi que sur les explants cutanés, montrent qu'ils ne diminuent pas la capacité des arthrospores de *T. rubrum* à adhérer à l'épiderme et à envahir la couche cornée.

Dès lors, il a été décidé de tester l'efficacité d'un peptide inhibiteur développé précédemment, i.e. un fragment peptidique issu du propeptide de Sub 3 nommé peptide 2d. Le peptide 2d est le meilleur candidat obtenu par la technique des peptides chevauchants. En effet, celui-ci présente un $IC_{50} \approx 10 \mu M$. Lors du test d'efficacité *in vitro*, le peptide 2d a révélé une capacité à diminuer l'adhérence précoce des arthrospores de *T. rubrum* aux épidermes reconstruits, comme aux explants, bien qu'il n'empêche pas le développement de l'infection à plus long terme. Le peptide inhibiteur 2d s'avère donc être le meilleur candidat en tant qu'inhibiteur de l'infection fongique bien que sa concentration efficace (40-80 μM) soit élevée et risque de poser problème en termes de coût pour la production et donc la commercialisation du produit.

L'un des objectifs principaux de la formulation galénique mise au point dans ce projet est d'assurer une rémanence efficace de l'actif antifongique au sein de la couche cornée et d'éviter autant que possible une pénétration à travers l'épiderme. Afin d'améliorer la rémanence du produit final sur la peau et donc d'obtenir une action prolongée, nous avons choisi de mettre au point une émulsion fluide et sprayable au moyen de silicones. Cette émulsion sprayable sera facile d'utilisation pour les patients (produit préventif donc d'utilisation chronique). Le peptide inhibiteur n'étant pas disponible, le miconazole a été sélectionné comme molécule modèle afin de valoriser les émulsions développées. Les études de diffusion sur peaux d'oreilles de cochon ont confirmé la capacité de l'émulsion de silicone à former un film à la surface cutanée assurant la persistance de l'actif sur la peau tout en évitant une pénétration du produit à travers l'épiderme. Après 24 heures, moins de 1% du miconazole diffuse à travers la peau, contrairement à l'émulsion de paraffine ou à la solution aqueuse qui entraînent un passage épidermique largement supérieur. Les résultats sur les modèles de RHE infectés par le dermatophyte *T. rubrum* montrent une bonne efficacité antifongique de l'émulsion siliconée contenant le miconazole. Nous pouvons donc conclure que nous avons atteint l'objectif de développer un **véhicule dermatologique permettant d'améliorer la rémanence au niveau de la couche cornée**, adapté à un actif antifongique (le miconazole) et potentiellement adaptable au peptide inhibiteur lorsque celui-ci sera disponible. L'émulsion siliconée pourrait être brevetée avec l'accord et la collaboration de l'entreprise Dow Corning qui a fourni les émulsions de base.

La mise au point du modèle murin d'infection à *T. rubrum* a d'abord été réalisée sur des souris C57BL/6. Les lésions cutanées développées par les souris inoculées sont représentatives d'une dermatophytose superficielle mais sont plus faibles, et disparaissent plus rapidement que les lésions couramment observées lors de l'infection par d'autres dermatophytes comme l'agent zoophile *Arthroderma benhamiae*. L'expérience a donc été poursuivie en inhibant de manière transitoire le système immunitaire des souris via l'utilisation de glucocorticoïdes. Les lésions observées durent plus longtemps mais disparaissent toujours très rapidement. Une tentative de mise au point sur des souris BALB/c *nude*, immunodéficientes, a été effectuée, mais celles-ci n'ont pas démontré de susceptibilité à l'infection dans les conditions expérimentales utilisées. En conclusion, le modèle *in vivo* de dermatophytose à *T. rubrum* doit encore être amélioré. Dès lors, le test d'efficacité des peptides inhibiteurs n'a pas pu être réalisé *in vivo*.

Par ailleurs, dans l'objectif initial, l'efficacité du délivrable devait également être testée sur des patients dans le service de Dermatologie du CHU du Professeur Arjen Nikkels. Cependant, par manque de temps, et suite à un consensus dégagé lors de la réunion de mi-parcours avec les experts, cet objectif a été modifié au cours du projet et a été remplacé par une étude de prévalence des dermatophytoses qui devait permettre de déterminer et de comparer la différence de prévalence des dermatophytoses entre une population témoin (issue du service de Dermatologie du CHU de Liège) et une population diabétique (issue du service de Diabétologie du CHU de Liège). Les échantillons obtenus sont toujours en cours d'analyse et aucune conclusion ferme ne peut actuellement être tirée.

V. Bibliographie

1. Degreef H., *Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection)*. Mycopathologia, 2008. **166**(5-6): p. 257-65.
2. Chermette R., Ferreiro L. and Guillot J., *Dermatophytoses in animals*. Mycopathologia, 2008. **166**(5-6): p. 385-405.
3. Monod M., *Secreted proteases from dermatophytes*. Mycopathologia, 2008. **166**(5-6): p. 285-94.
4. Baldo A., et al., *Secreted subtilisins of Microsporum canis are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes*. Journal of Medical Microbiology, 2008. **57**(9): p. 1152-6.
5. Baldo A., et al., *Secreted subtilisin Sub 3 from Microsporum canis is required for adherence to but not for invasion of the epidermis*. British Journal of Dermatology, 2010. **162**(5): p. 990-7.
6. Bagut E.T., et al., *Subtilisin Sub 3 is involved in adherence of Microsporum canis to human and animal epidermis*. Veterinary Microbiology, 2012. **160**(3-4): p. 413-9.
7. Baldo A., et al., *Inhibition of the keratinolytic subtilisin protease Sub 3 from Microsporum canis by its propeptide (proSub 3) and evaluation of the capacity of proSub 3 to inhibit fungal adherence to feline epidermis*. Veterinary Microbiology, 2012. **159**(3-4): p. 479-84.
8. Tabart J., et al., *Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for Microsporum canis dermatophytosis*. Journal of Medical Microbiology, 2007. **56**: p. 971-75.
9. De Vuyst E., et al., *Reconstruction of normal and pathological human epidermis on polycarbonate filter*. Methods in Molecular Biology, 2014. **1195**: p. 191-201.
10. Seebacher C., Bouchara J.P., and Mignon B., *Updates on the epidemiology of dermatophyte infections*. Mycopathologia, 2008. **166**: p. 335-52.
11. Faway E., et al., *Modeling dermatophytosis in reconstructed human epidermis: A new tool to study infection mechanisms and to test antifungal agents*. Medical Mycology, 2017. **55**: p. 485-494.
12. Paugam, A., et al., *Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis*. Journal of Microbiological Methods, 2013. **95**: p. 218-222.

Les dermatophytoses, aussi appelées « teignes », sont des lésions affectant la couche superficielle de l'épiderme, les ongles et les cheveux, provoquées par des champignons filamenteux kératinophiles et kératinolytiques appelés dermatophytes. Leur prévalence chez l'homme est estimée entre 20 et 25% et continue d'augmenter, surtout au sein de populations à risque comme les sportifs ou les patients diabétiques. L'espèce anthropophile *Trichophyton rubrum* est responsable de 90% des infections chez l'homme. Bien que les dermatophytoses ne mettent pas la vie en danger, elles provoquent douleur et inconfort. Le traitement par des molécules antifongiques est efficace, mais il est long, coûteux et peut s'accompagner d'effets indésirables. De plus, il ne protège pas contre les réinfections pourtant fréquentes. Dans ce contexte, la mise au point d'un traitement préventif, à destination des populations à risque, représenterait une avancée dans le contrôle des dermatophytoses. À ce jour, le développement d'un tel traitement est limité par le manque de connaissances concernant la biologie des dermatophytes, les mécanismes impliqués dans l'infection et la mise en place d'une réponse immunitaire efficace anti-dermatophytes.

Au cours de ce travail, la mise au point d'un modèle *in vitro* d'infection sur épiderme humain reconstruit (RHE) a permis l'étude du développement de la dermatophytose cutanée et de la mise en place des réponses immunes du tissu.

Premièrement, un modèle d'infection par les arthrospores du dermatophyte *T. rubrum* sur RHE a été développé. L'étude des mécanismes d'adhérence des arthrospores à l'épiderme a révélé l'implication probable de la protéase fongique de type subtilisine Sub3 dans cette étape du cycle d'infection. La germination des arthrospores se produit dans les premières heures suivant l'infection et les hyphes qui en résultent envahissent le tissu par progression dans les espaces intercellulaires. Par ailleurs, l'application topique de miconazole, un antifongique largement utilisé, inhibe le développement de l'infection sur les RHE. Le modèle est donc un outil valide pour tester l'efficacité de candidats antifongiques.

Dans une seconde partie, les modifications du tissu épidermique ainsi que la réponse des kératinocytes face à l'infection ont été étudiées. Après quatre jours, l'infection des RHE résulte en une rupture de la barrière épidermique, parallèlement à une perturbation des jonctions étanches. Au même moment, les kératinocytes produisent et libèrent différentes cytokines pro-inflammatoires et peptides antimicrobiens, destinés à recruter le système immunitaire pour combattre l'infection. La survenue simultanée de ces deux événements suggère une relation de cause à effet.

En conclusion, ce travail a permis l'étude de la pathogénie de la dermatophytose à *T. rubrum* au moyen d'un modèle d'épiderme humain reconstruit *in vitro*. Le modèle et les outils mis au point devraient permettre d'approfondir davantage la compréhension des mécanismes impliqués dans l'infection et dans la réponse de l'hôte.

Emilie
Faway

Mars
2018